



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **APLICAÇÃO DE DERIVADOS DE GLÚCIDOS NO DESIGN DE FÁRMACOS**

Trabalho submetido por  
**Sandra Isabel Galvão Guiu**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Setembro de 2015**



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **APLICAÇÃO DE DERIVADOS DE GLÚCIDOS NO DESIGN DE FÁRMACOS**

Trabalho submetido por  
**Sandra Isabel Galvão Guiu**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Doutora Paula Correia da Silva**

**Setembro de 2015**



### **Dedicatória**

---

Quero dedicar o meu trabalho final de curso à minha mãe Cristina Maria Dias Galvão  
Guiu e a um grande amigo Tiago Romão, pois sem o seu apoio e paciência, teria sido  
mais difícil de concluir a tese



## RESUMO

Os glúcidos são considerados a classe de moléculas orgânicas mais abundante na natureza. Quase todos os organismos vivos sintetizam e/ou metabolizam glúcidos. Durante muitos anos ácidos nucleicos, proteínas e lípidos foram o principal foco de atenção pelos investigadores, provavelmente pelo fato de os glúcidos serem bastante complexos e não estarem codificados no genoma. No entanto recentemente a área da glicobiologia tem-se expandido de forma considerável.

A glicosilação representa um dos processos mais complexos na modificação pós-tradução das proteínas, as glicoproteínas resultantes possuem uma elevada diversidade estrutural, principalmente devido a capacidade de os monossacáridos poderem ramificar. Estes glicanos sintetizados migram para a superfície celular, onde desempenham inúmeros papéis importantes no processo de reconhecimento celular como a adesão celular, endocitose e metastização do tumor.

Alterações dos padrões de glúcidos que revestem a superfície das células estão muitas vezes associadas a doenças como a fibrose cística, doenças auto-imunes e cancro.

Ácidos siálicos e resíduos de fucose, são monossacáridos geralmente presentes em diversos epítomos como os antígenos de Lewis (  $Le^b$ ,  $Le^y$ ,  $sLe^a$ ,  $sLe^x$  e outros). No entanto no cancro existe uma super-expressão do epítomo  $sLe^x$ . Este epítomo foi encontrado em excesso em diversos tecidos neoplásicos incluindo do pâncreas, da mama, pulmões e colon e parece haver uma associação desta elevada expressão à progressão do cancro e metastização, embora ainda não sejam muito conhecidos os mecanismos de ação.

O design de derivados de glúcidos como inibidores das fucosiltransferases, enzimas reesponsáveis pela fucosilação dos epítomos, tem sido bastante investigado nos últimos anos, como possível tratamento para o cancro. Os inibidores das fucosiltransferases com base em glúcidos dividem-se em análogos dos substratos doadores, análogos dos substratos aceitadores e bisubstratos.

**Palavras-chave:** Fucose, Cancro, Glicosilação, Inibidores de fucosiltransferases

## **ABSTRACT**

Carbohydrates are the most abundant class of organic molecules found in nature. Most of all live organism synthesize and metabolize carbohydrates. For many years, the nucleic acids, proteins and lipids have been the center of attention by investigators worldwide. This was probably due to the complexity of carbohydrates and the fact that they are not encoded in genome. Recently carbohydrates have received increased attention through the expanding field of glycobiology.

Glycosylation represents one of the most complex types of post-translation modifications of proteins. The high structural diversity is mainly due to the ability of branching of monosaccharides. These synthesized glycans migrate to the cell surface, where they play many important roles in cell recognition process as cell adhesion, endocytosis and tumor metastasis.

Changes in carbohydrate patterns which coats the surface of cells are often associated with diseases such as cystic fibrosis, autoimmune diseases and cancer. Sialic acid and fucose residues are monosaccharides that are generally present in various epitopes such as the Lewis antigens (Leb, Ley, sLea, and other sLex). However in cancer, there is an overexpression of the sLex epitope. This epitope was found in excess in several neoplastic tissues including pancreas, breast, lung and colon and seems that the high expression is correlated with cancer progression and metastization.

Design of carbohydrate derivatives as inhibitors of fucosyltransferases, enzymes responsible for the fucosylation of epitops, has been widely investigated in recent years as a possible treatment for cancer. These fucosyltransferases inhibitors based on carbohydrates are divided into donor substrate analogs, acceptor analogs and bisubstrates

**Keywords:** Fucose, Cancer, Glycosylation, Fucosyltransferase inhibitors

## ÍNDICE

RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
ÍNDICE .....	7
ÍNDICE DE FIGURAS .....	8
ÍNDICE DE TABELAS .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS .....	11
NOTA INTRODUTÓRIA .....	13
1. IMPORTÂNCIA DOS GLÚCIDOS NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS .....	15
1.1. Interação entre as lectinas e os glúcidos .....	17
2. INTRODUÇÃO AO CANCRO .....	23
3. NOVAS TECNOLOGIAS NA ÁREA DA MEDICINA NUCLEAR UTILIZAM GLÚCIDOS .....	27
4. VÁRIAS LINHAS DE TRATAMENTO NO CANCRO .....	31
4.1. Açúcares como ligandos para direcionar fármacos .....	33
5. ENZIMAS FUCOSILTRANSFERASES E FUCOSIDASES .....	41
5.1. Funções da L-fucose .....	41
5.2. Fucosiltransferases e fucosidases .....	42
5.3. Síntese da GDP-Fucose, via de novo e via salvage .....	46
5.4. A relação entre a fucosilação e doenças, especialmente o cancro .....	48
5.5. Estrutura e mecanismo das fucosiltransferases .....	49
5.6. Inibidores das fucosiltransferases .....	50
6. CONCLUSÃO .....	59
7. BIBLIOGRAFIA .....	61



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Representação da complexidade e heterogeneidade dos glúcidos nas proteínas e lípidos inseridos na membrana plasmática. ....	20
<b>Figura 2</b> Representação de possíveis interações que existem entre lectinas e oligossacáridos.....	20
<b>Figura 3</b> Representação de um pet/tac com FDG num indivíduo com linfoma de Hodgkin.....	29
<b>Figura 4</b> Representação de um pet/tac de um paciente do sexo feminino de 48 anos com linfoma de Burkitt. ....	29
<b>Figura 5</b> Representação das características fisiológicas do tecido tumoral e vasculares que facilitam a entrada do fármaco no tumor .....	34
<b>Figura 6</b> Representação esquemática do que acontece num HPMa conjugado quando chega a célula alvo.....	37
<b>Figura 7</b> Representação esquemática do pró-fármaco conjugado com o polímero PEG, o NAG, glutatona e o fármaco doxorrubicina .....	39
<b>Figura 8</b> Fucosilação catalisada pela $\alpha$ -1,3-fucosiltransferase. ....	44
<b>Figura 9</b> Estruturas de antígenos de Lewis fucosilados pelas enzimas $\alpha$ -1,2 e $\alpha$ -1,3-fucosiltransferases. A sublinhado estão os açúcares tipo II e tipo I. ....	45
<b>Figura 10</b> Representação esquemática das duas vias de biossíntese de GDP-fucose nas células mamíferas. ....	47
<b>Figura 11</b> Representação do mecanismo catalítico da $\alpha$ -1,3-FucT da H.pylori. as linhas a tracejado representam as pontes de hidrogénio .....	50
<b>Figura 12</b> Representação do GDP-2F-Fuc .....	52
<b>Figura 13</b> Representação do GDP-6F-Fuc .....	52
<b>Figura 14</b> Representação de um carba-açúcar saturado.....	53
<b>Figura 15</b> Representação de um carba açúcar com ligação dupla .....	54
<b>Figura 16</b> Representação de um carba açúcar com ligação dupla e um grupo metil que liga o grupo difosfato à fucose. ....	54
<b>Figura 17</b> Representação de dois análogos iminoaçúcares ou Azaçúcares .....	55
<b>Figura 18</b> Representação estrutural de três compostos análogos do estado de transição .....	56
<b>Figura 19</b> Representação de um modelo computacional do composto 4 ligado ao sítio ativo da FucT-pylori. ....	56

<b>Figura 20</b> Representação de uma N-acetil-lactosamina ligada a um grupo hidrofóbico .....	57
<b>Figura 21</b> Representação de um inibidor bisubstrato.....	58

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Distribuição das diferentes fucosiltransferases nos tecidos, os seus respetivos substratos aceitadores e produtos resultantes .....	46
<b>Tabela 2:</b> valores de $IC_{50}$ e $k_i$ dos compostos 3-5 para as várias fucts.....	57

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ADME– Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção

ASGP-R – Asialoproteínas- recetores

ATP – Adenosina Trifosfato

CAZY– Carbohydrates-Active enzymes database

CRD – carbohydrate receptor domain

DOX – Doxorubicina

EPR – enhanced permeability and retention

FucT –Fucosiltransferase

FDG – Flúor-deoxi-glicose

Gal – Galactose

Glc – Glicose

GDP – Guanosina difosfato

GTP – Guanosina trifosfato

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HPMA-DOX-Gal – Copolímero de N-(2-hidroxipropil) metacrilamida

IC<sub>50</sub> – Concentração de inibição média

K<sub>i</sub> – Constante de inibição

LacNAc – N-acetil-lactosamina

Leu – leucina

MBPs – Manose-binding-proteins

NAc – N-acetil

NAG – N-acetil-glucosamina

PEG –polietilenoglicol

PET – Tomografia por Emissão de Protões

PGA – Ácido poliglutâmico

Phe – Fenilalanina

TAC –Tomografia axial computadorizada

Trp – Treonina

## NOTA INTRODUTÓRIA

O design de um fármaco envolve vários passos antes de chegar à parte dos ensaios clínicos. O primeiro processo consiste em escolher a área terapêutica que tem interesse para a indústria desenvolver, neste ponto são avaliados possíveis custos da investigação, benefícios para a saúde pública e vantagens financeiras que podem advir do novo fármaco (Patrick, 2009).

No passo seguinte são selecionados os alvos terapêuticos no sentido de desenvolver um fármaco específico e o mais seletivo possível para que interaja apenas com aquele recetor ou enzima, de modo a que os efeitos indesejáveis sejam reduzidos, para que isto seja exequível é crucial o investigador conhecer bem a estrutura do alvo e a molécula que interage com esse alvo. É neste contexto que a biologia e a química se fundem, sendo duas áreas importantíssimas para o desenvolvimento de novos fármacos que no presente trabalho é a glicobiologia, a química dos açúcares (Mandal, et al 2009).

Tradicionalmente um novo fármaco era descoberto através da síntese de vários compostos que de seguida seriam testados, onde o maior ênfase era dado à parte farmacodinâmica, assim as interações moleculares do fármaco com o alvo terapêutico eram o foco principal dos cientistas, descurando a parte farmacocinética. Todo este processo era muito moroso e envolvia custos muito avultados para a indústria farmacêutica, dentro dos muitos compostos sintetizados apenas alguns seguiam para a fase seguinte da investigação a partir do qual a maior parte dos fármacos candidatos falhavam devido a problemas farmacocinéticos e toxicidade (Sharma et al, 2013).

Atualmente o processo de design de novos fármacos foi revolucionado, com a introdução de novas áreas como a proteómica, genómica e bioinformática e ainda de tecnologias eficientes como a química combinatória, estudos *in silico* ADME entre outras. Estas novas técnicas ou meios permitem testar num estadio inicial da investigação de um fármaco, quais as moléculas com maior potencial de desenvolvimento. As moléculas selecionadas são então sintetizadas e isto permite uma maior redução de tempo e gastos consumidos, a farmacocinética por outro lado também é avaliada logo no processo inicial da investigação (Patrick, 2009; Sharma et al., 2013).

Vários fármacos aprovados pelo FDA possuem na sua constituição resíduos de açúcares, seja para melhorar a farmacodinâmica ou a farmacocinética do fármaco, por exemplo a doxorrubicina, um fármaco anticancerígeno pertencente ao grupo das antraciclinas, atuam intercalando-se com as cadeias de DNA e no qual a porção glicosídica, um amino-açúcar desempenha uma papel importante na estabilização do complexo fármaco-DNA (Airley, 2009; Klyosov, 2012).

Existem também fármacos que são oligossacáridos complexos como a acarbose, fármaco utilizado no tratamento de diabetes mellitus tipo 2, este composto ativo é formado por um conjunto de resíduos de açúcares ligados entre si que inibem reversivelmente a enzima  $\alpha$ -glicosidase no lumen intestinal, impedindo que os oligossacáridos sejam hidrolisados a trissacáridos e de dissacáridos a glucose, retardando absorção de açúcar depois de uma refeição (Deuiter, 2003; Klyosov et al; 2012).

Apesar destes fármacos e outros com base em glúcidos já existirem no mercado desde algum tempo, o interesse no design de açúcares como fármacos alvo tem sofrido um crescimento brutal recentemente com a descoberta mais aprofundada do papel dos glúcidos nos sistemas biológicos (del Carmen Fernández-Alonso et al, 2012).

A capacidade de vários tipos de resíduos de açúcares estabelecerem ligações entre si, o tipo de ligação anomérica e ainda a capacidade poderem ramificar e estabelecer ligações com outras moléculas como as proteínas, torna os açúcares bastante complexos e diversificados. Atualmente são conhecidas diversas funções que os açúcares desempenham no organismo. Para além do armazenamento de energia e de fazerem parte de várias estruturas celulares, os açúcares também encontram-se conjugados com proteínas e lípidos na superfície das células, estando envolvidos em diversos processos importantes como o reconhecimento celular, regulação e crescimento celular. Alterações nas estruturas destes açúcares estão associados geralmente a doenças auto-imunes e também ao cancro (Morrison e Boyd 1992; Patrick, 2009; Ghazarian et al, 2011).

Ácidos siálicos e resíduos de fucose, são dois açúcares que se encontram na parte terminal dos de muitos epitopos e que estão expressos de forma excessiva em diversos tipos de cancro, embora seja ainda desconhecido o mecanismo. Atualmente os cientistas acreditam que este excesso de fucose está relacionado com a progressão do tumor e metastização (Lin et al, 2012).

Neste trabalho irão ser abordadas de forma sumária algumas estratégias de design de fármacos com base em derivados de glúcidos no tratamento do cancro e mais detalhadamente os inibidores das fucosiltransferases com base numa revisão de várias literaturas.

## **1. IMPORTÂNCIA DOS GLÚCIDOS NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS**

Os glúcidos constituem uma das classes de moléculas orgânicas mais abundante nos sistemas vivos. Durante anos ácidos nucleicos, lípidos e proteínas foram o principal foco de investigação pelos cientistas na área celular, mas recentemente, os açúcares ou glúcidos têm suscitado bastante interesse principalmente por estarem implicados em diversas funções (Aldridge, 2008).

Os açúcares cuja fórmula empírica é  $[C_x(H_2O)_y]$  são compostos orgânicos muito abundantes na natureza, quase todos os organismos sintetizam e/ou metabolizam estes compostos (Khowala et al, 2008).

Os açúcares fazem parte de muitas estruturas das células, como a celulose que é um polímero de glucose que dá suporte às paredes das células vegetais, os ácidos nucleicos que codificam a informação genética e as glicoproteínas que são recetores na superfície das células. Estes são apenas alguns exemplos do papel dos açúcares nos organismos vivos. Para além disto, todos os açúcares constituem a principal fonte de obtenção de energia para a sobrevivência de todos os seres (Morrison e Boyd, 1992).

A partir dos monossacáridos podem ser construídos uma grande variedade de estruturas glucídicas, esta complexa heterogeneidade dos açúcares nos organismos vivos é resultado de uma série de características dos açúcares como a capacidade dos monossacáridos poderem estabelecer ligações glicosídicas através de várias posições dos seus anéis de piranose ou furanose, o tipo de ligação anomérica e a presença ou ausência de estruturas ramificadas (Morrison e Boyd, 1992; Patrick, 2009).

Duas moléculas de glucose podem formar onze dissacáridos diferentes enquanto duas moléculas de glicina por exemplo, apenas podem formar um único dipéptido, o que ilustra a variedade de compostos que os monossacáridos podem formar (Ghazarian et al, 2011).

Apesar da sua grande variedade nos sistemas biológicos, os açúcares não estão codificados no genoma como os ácidos nucleicos, as proteínas e os lípidos. O genoma apenas codifica as enzimas glicosiltransferases e glicosidases, enzimas implicadas na glicosilação dos glicolípidos e das glicoproteínas (Murphy et al, 2013; Witczak et al, 2014).



Os glúcidos possuem a capacidade de interagir com vários compostos, incluindo uma grande família de proteínas como as lectinas, anticorpos, transportadores de açúcares e uma grande família de enzimas (del Carmen Fernández-Alonso et al, 2012).

Todas as células estão revestidas por complexos de glúcidos designados por glicanos que formam uma camada com uma espessura entre 10 a 100nm, denominada de glicocálice. Estes glicanos encontram-se na forma conjugada designando-se como glicoconjugados, como as glicoproteínas, proteoglicanos e glicolípidos (Ernst e Magnani, 2009).

Os glicanos tanto livres como conjugados nas superfícies das células desempenham várias funções como moléculas sinalizadoras, moléculas de reconhecimento e moléculas de adesão (Witczak et al., 2014).

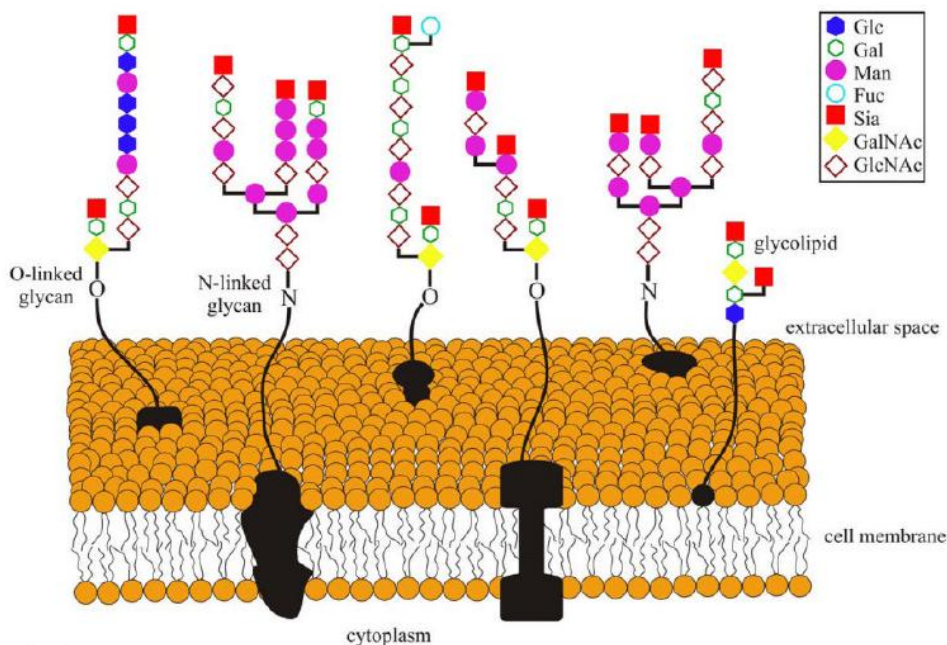
Apesar de se conhecer bem as propriedades físicas e químicas dos açúcares simples, infelizmente ainda não há muito conhecimento ou informação acerca dos açúcares nos sistemas vivos, devido à sua elevada complexidade. No entanto nos últimos anos, têm-se feito grandes avanços nesta área da glicobiologia, com aplicação de novas tecnologias como a difração por raios X e a ressonância magnética nuclear que tem permitido conhecer a geometria da interação entre proteínas e glúcidos a nível atómico (del Carmen Fernández-Alonso et al, 2012).

As unidades de monossacáridos utilizadas na construção dos glicanos nos vertebrados são nove: a glucose, galactose, manose, N-acetilglucosamina, ácido glucorónico, N-acetilgalactosamina, ácido siálico, fucose e a xilose (Varki et al, 2009).

Como já foi referido acima, os oligossacáridos podem encontrar-se livres ou ligados a proteínas e lípidos na superfície das células. Os oligossacáridos que formam ligações glicosídicas com as proteínas podem fazê-lo através de dois tipos de ligação, a N-ligação quando envolve a N-acetilglucosamina do oligossacárido e o grupo amida da asparagina, e a O-ligação que se estabelece entre o carbono 1 da N-acetilgalactosamina e o grupo hidroxilo da serina ou treonina (Stanley et al, 2009).

A produção das glicoproteínas ocorre no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, onde se situam as enzimas glicosiltransferases e glicosidases que catalisam reações de remoção e adição dos monossacáridos (Varki et al, 2009).

Como estes glicoconjugados desempenham importantes papéis no funcionamento biológico, alterações nos padrões de glicosilação, alteram as suas atividades estando associados ao desenvolvimento de doenças crónicas como o cancro (Ghazarian et al., 2011)



**Figura 1:** Representação da complexidade e heterogeneidade dos glúcidos nas proteínas e lípidos inseridos na membrana plasmática. Os resíduos de fucose e ácidos siálicos localizam-se geralmente na extremidade dos glicoconjugados. Adaptado de: Ghazarian et al, 2011.

### 1.1. Interação entre as lectinas e os glúcidos

As lectinas são definidas como proteínas ou glicoproteínas, não imunológicas, que reconhecem e se ligam especificamente aos epítomos glucídicos das glicoproteínas, glicolípidos e também a oligossacáridos livres circulantes, sem no entanto os modificar. Esta ligação é muito específica, como de um anticorpo-antigénio ou enzima substrato (Ambrosi et al, 2005).

No entanto as interações entre as lectinas e os monossacáridos são muito fracas, com constantes dissociações na ordem dos micromolar aos milimolares (del Carmen Fernández-Alonso et al, 2012).

A descoberta das lectinas teve início em 1888 por Herrmann Stilmark, um estudante doutorado da Universidade de Dorpat na Estonia. Este cientista demonstrou que uma

determinada proteína presente na semente Ricinus Comuni, era a causa da aglutinação dos eritrócitos. As plantas segregam lectinas como mecanismo de defesa contra parasitas e predadores. Atualmente, sabe-se que as lectinas estão presentes em todos os organismos vivos incluindo plantas, microrganismos, animais e seres humanos (Ambrosi et al, 2005; Fonseca e Soto-Blanco, 2014).

As lectinas possuem uma região constituída por uma determinada sequência de aminoácidos designadas por domínio de reconhecimento de glúcidos (carbohydrate recognition domain, CRD) ao qual se ligam os glúcidos (Wood-Charlson e Weis, 2009)

As lectinas endógenas estão envolvidas em muitos processos biológicos, sendo responsáveis pelo reconhecimento celular, desenvolvimento embrionário, crescimento celular, apoptose, adesão celular e migração, imunomodulação e inflamação, indução mitogénica e homeostase (Wood-Charlson e Weis, 2009).

As lectinas podem ser proteínas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , ter um ou mais CRDs e podem estar associados a glúcidos ou não. Várias sequências altamente conservadas de CRDs já foram identificadas, o que permitiu aos investigadores agruparem as lectinas em superfamílias e famílias. As lectinas tipo C, CTLs, são as superfamílias de lectinas mais abundantes nos animais. Esta superfamília está dividida em três famílias: as selectinas, colectinas e galectinas (Holmskov et al, 2003).

A família das selectinas incluem as E-, L- e P-selectinas e ligam-se especificamente a dois tipos de oligossacáridos as  $\text{sLe}^x$  e  $\text{sLe}^a$  e participam nas funções de defesa do sistema imunitário contra a invasão de agentes patogénicos ou agentes estranhos ao organismo. Estas selectinas L e P por exemplo encontram-se abundantemente na superfície dos linfócitos T imaturos, estas selectinas reconhecem e ligam-se especificamente às células das vénulas endoteliais altas para chegarem aos nódulos linfáticos onde os linfócitos sofrem depois maturação. Os linfócitos ativados não possuem selectinas, isto permite que se escapem para os tecidos inflamados (Ley, 2003).

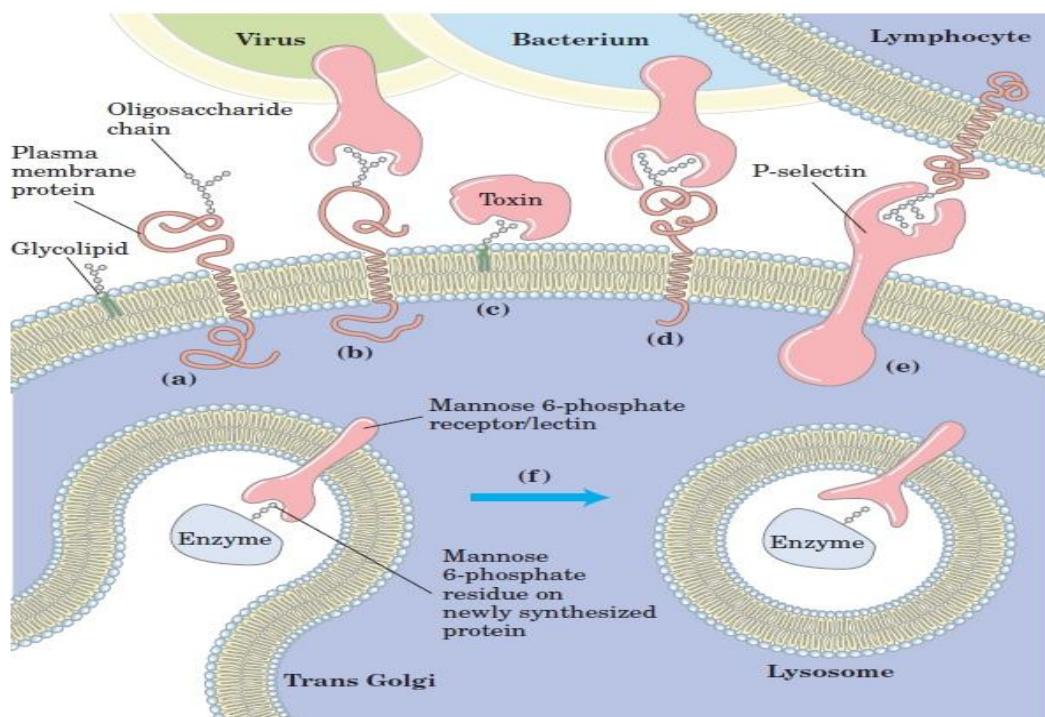
As galectinas são proteínas não glicosiladas, solúveis e independentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e podem ser encontradas no espaço intra e extracelular. Atualmente foram já identificadas 15 tipos de galectinas e todas se ligam às N-acetil-lactosaminas ao reconhecerem os resíduos de beta-galactose. As galectinas estão envolvidas numa grande variedade de

funções biológicas que incluem o splicing do RNAm, regulação do crescimento celular, adesão celular, embriogénese, inflamação, função imunitária e apoptose (Klyosov, 2014).

Vários estudos identificaram um aumento da expressão de galectinas 3 em vários tipos de tumores, como da tiroide, colorectal e outros, existindo um forte indicação de que as galectinas possam estar envolvidas no processo de crescimento das células tumorais e também na metastização (Danguy et al, 2002).

As colectinas são lectinas que estão envolvidas no reconhecimento do vírus de infeção respiratória de bactérias patogénicas. Os MBPs (manose-binding-proteins) são um exemplo de colectinas importantes na defesa imunitária. Estas lectinas reconhecem resíduos de manose presentes na superfície das bactérias e fungos. A interação resultante entre eles permite a adesão do microrganismo à célula hospedeira que por sua vez ativa o sistema complemento imunitário, aumentando a opsonização, fagocitose e neutralização dos patogénicos pelos macrófagos (Holmskov et al, 2003).

Por outro lado, para os patogénicos iniciarem uma infeção ligam-se aos glicanos das células do hospedeiro. A *Escherichia coli* (E.coli), por exemplo liga-se aos resíduos de manose, o vírus influenza liga-se aos ácidos siálicos das células do hospedeiro e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) interage com os recetores CD4 das células T através da glicoproteína 120 (gp-120) que é altamente glicosilada com oligomanose (Queeg et al, 1994).



**Figura 2:** Representação de possíveis interações que existem entre lectinas e oligossacáridos. (a) glicoproteínas e glicolípido projetam os glicanos na matriz extracelular para que possam interagir com as lectinas de outras células (b) lectina do vírus influenza reconhece a glicoproteína da célula do hospedeiro e adere para iniciar a infecção (c) toxinas de bactéria por exemplo da cólera ou toxina pertussis da tosse convulsa ligam-se aos glicolípido antes de entrarem na célula (d) bactérias como a *H.pylori* aderem aos oligossacáridos da célula hospedeira para depois colonizarem ou infetarem as células animais (e) interação entre a selectina-P e o linfócito quando há uma infecção (f) o recetor contendo manose 6-fosfato recém-sintetizado no complexo de Golgi, liga-se ao oligossacárido das enzimas lisossomais, este complexo é de seguida transferido para os lisossomas. Adaptado de: Queeg et al, 1994.

Como a maior parte das patologias tem início na interação entre glúcidos e proteínas, a exploração de novos fármacos tem sido amplamente estudada de forma atingir estes alvos (Klyosov et al, 2012).

Uma das estratégias consiste na terapêutica anti-adesiva. Atendendo a que muitos organismos patogénicos utilizam os glicanos dos recetores das células do hospedeiro para aderirem e iniciar a sua infecção, o design de moléculas de glúcidos que mimetizem esses glicanos para se ligarem às lectinas dos microrganismos, tem sido desenvolvido para impedir a sua adesão as células. Esta terapêutica anti-adesiva oferece muitas vantagens relativamente à terapia convencional pois pode reduzir significativamente os efeitos adversos e evitar a emergência de estirpes resistentes aos antibióticos (Ernst e Magnani, 2009).

Outras aplicações incluem o desenvolvimento de vacinas com base em glúcidos contra o HIV. Embora estejam a ser investigadas desde algumas décadas vacinas para prevenir o HIV, nenhuma foi ainda aprovada pelo FDA. Uma das grandes limitações deve-se ao fato de existirem várias estirpes e subtipos do vírus HIV e também à sua grande capacidade de mutar (Haynes et al, 2014).

Geralmente o sistema imunitário reconhece as proteínas de um vírus produzindo como resposta ao invasor, anticorpos específicos para eliminar o vírus do organismo. No entanto o vírus HIV apresenta um revestimento muito denso de glúcidos que encobre as proteínas e como os glúcidos são muito pouco imunogénicos, acabam por funcionar como um escudo que impede de o sistema imunitário reconhecer os antígenos do vírus e produzir os anticorpos necessários para erradicar o vírus. Com base nesta abordagem tem sido avaliadas novas vacinas que contenham glúcidos que façam parte do vírus HIV combinadas com um adjuvante que potencie a resposta imunitária (Klyosov et al, 2012; Raska et al, 2014).

O uso de glúcidos no desenvolvimento de fármacos anticancerígenos também tem sido bastante explorado. O cancro é uma patologia bastante complexa, envolvendo diversos fatores, e dependendo do tipo de cancro pode atingir qualquer idade ou sexo e é fatal em muitos casos. É considerada mesmo por muitos autores como a doença atual e do futuro por haver cada vez mais casos. A aplicação de derivados de glúcidos no design de fármacos anti-cancerígenos será mais detalhada para a frente (Klyosov et al, 2012).



## 2. INTRODUÇÃO AO CANCRO

O cancro é uma doença bastante complexa e heterogénea, sendo uma das maiores causas de morte em todo o mundo. É uma doença bastante atual e considerada por muitos a doença do futuro (Ledoux e Cloutier, 2012).

Uma grande parte dos diagnósticos de cancro ocorre a partir dos 65 anos ou mais. A International Agency for Research on Cancer (IARC) apenas com base no envelhecimento da população prevê um aumento de 13,7% de novos casos para a União Europeia. Estima-se também que futuramente o número de mortes por cancro possa aumentar dramaticamente a não ser que novas e melhores formas de prevenir, tratar e detetar sejam desenvolvidas (Lives, 2012).

Desde o nascimento até á vida adulta existe um controle genético que regula o equilíbrio entre o nascimento e a morte celular através de produção de fatores de crescimento, inibição do crescimento e morte celular. No entanto quando ocorrem mutações no DNA devido por exemplo a uma exposição longa a carcinogenios, em que os mecanismos de reparação do DNA são ineficazes, pode haver um descontrole entre o crescimento e a proliferação celular (Lodish et al, 2004).

Mutações em duas grandes classes de genes estão na origem da perda da regulação celular, os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais. Mutações nos proto-oncogenes levam a ativação dos oncogenes que causam estimulação excessiva do crescimento celular. Os genes supressores tumorais são genes que limitam o crescimento e portanto a sua mutação leva a um descontrole e a um crescimento excessivo das células (Lopes et al, 2002; Lodish et al, 2004).

Pode haver uma pré-disposição genética para a pessoa desenvolver cancro, no entanto a principal causa são os fatores ambientas como as radiações ultra-violeta, estilo de vida alimentar (consumo de ácidos gordos poli-insaturados que conduzem a formação de radicais livres que podem danificar o DNA), o álcool, sendo estes os fatores causadores de cancro predominantes nos países desenvolvidos. Existem também tipos de cancro despoletados por agentes infecciosos como o vírus da hepatite B, o papiloma vírus e a bactéria *Helicobacter Pylori* que podem levar ao desenvolvimento do cancro do fígado, cancro do colo do útero e cancro do estômago, respetivamente (Garófolo et al, 2004).



As mutações ocorrem na maioria nas células somáticas e não nas células germinativas, e por isso não passam às gerações seguintes. Quando ocorre nas células germinativas, as mutações tornam-se hereditárias e aumentam a probabilidade da descendência originar o cancro. Portanto o cancro pode ser considerado uma doença genética multifatorial (Ledoux e Cloutier, 2012).

Geralmente o cancro deve-se a uma série de mutações em vários genes e não só num. Estas mutações criam um tipo celular com capacidade proliferativa descontrolada e rápida, assim estes erros genéticos são passados às células filhas durante a divisão e assim sucessivamente gerando um clone de células denominado de tumor (Loeb et al, 2000; Lodish et al, 2004).

Outra alteração fenotípica nas células cancerosas é o facto de conseguirem escapar ao sistema imunitário de vigília, alterações ao nível dos glicanos que revestem a superfície das células constitui outra importante diferença entre as células malignas e as células normais. Alterações ao nível dos açúcares na superfície das células são comuns nas células malignas. Esta alteração pode estar relacionada com mutações nos genes que expressam as enzimas responsáveis pela glicosilação. Os ácidos siálicos e os resíduos de fucose são açúcares que se encontram tipicamente na posição terminal de várias classes de moléculas glicanos mas nos tumores parece haver uma expressão maior destes glúcidos. Estas alterações nos padrões de glicosilação sugerem haver um envolvimento dos açúcares no potencial de metastização das células malignas (Ghazarian et al., 2011).

As células malignas podem ter a capacidade de disseminar pelo corpo através da corrente sanguínea, formando tumores noutras partes do corpo. Esta capacidade de metastização é uma das principais características que distingue os tumores benignos dos malignos (Ledoux e Cloutier, 2012).

O sucesso de uma célula metastática desenvolver um novo tumor noutra local do organismo depende do tipo de tecido invadido e também da sua capacidade para produzir fatores de crescimento e angiogénicos para dar origem a novos vasos sanguíneos que consigam dar o aporte nutricional necessário (Ledoux e Cloutier, 2012).

Uma vez que mais de 30% dos cancros são causados pelo estilo de vida e fatores ambientais nocivos, uma maneira de reduzir a probabilidade de desenvolver um cancro será a prevenção (Lodish et al, 2004).

O tratamento do cancro passa pela cirurgia, quando a remoção do tumor é possível, outra opção é a radioterapia combinada com fármacos antineoplásicos (Lu e Mahato, 2009).

O tratamento do cancro pode ser bem sucedido através da cirurgia, radioterapia e quimioterapia, quando as células malignas formam um tumor confinado a uma área limitada. No entanto quando já existem metástases o tratamento torna-se mais difícil, sendo a principal causa de morte por cancro (Lu e Mahato, 2009).

Existem fármacos antimetabolitos, alquilantes, inibidores mitóticos ou hormonas, e todos eles de alguma maneira interferem com a replicação do DNA, reparação e divisão da célula. Existem ainda outros fármacos novos, como os anticorpos monoclonais. Os anticorpos anti-VEGF, por exemplo, ligam-se ao fator de crescimento do endotélio vascular impedindo a formação de novos vasos sanguíneos, portanto tem um efeito anti-angiogénico (Society, 2013)

Um dos grandes problemas destes fármacos deve-se à sua falta de especificidade. São fármacos que atingem mais facilmente as células tumorais por serem células mais permeáveis uma vez que estão em constante divisão, no entanto existem outros tipos de células que também proliferam rápido como as células da medula óssea levando a anemia, os folículos pilosos provocando queda de cabelo e outros mais. Para além destes efeitos adversos, e da margem segurança pequena, existem outros problemas como o surgimento de resistências, principalmente nos fármacos citostáticos (Lu e Mahato, 2009).

Com o intuito de diminuir os efeitos colaterais, vários estudos têm sido feitos no sentido de desenvolver novos fármacos que sejam mais específicos para o alvo terapêutico e o desenvolvimento de fármacos com base em glúcidos tem sido uma grande aposta numa nova abordagem a terapêutica anticancerígena (Carversesi e Hergenrother, 2014).

Atualmente existem vários fármacos no mercado que contêm glúcidos nas suas formulações, seja como princípios ativos como a acarbose e a epirrubicina ou como excipientes, como a ciclodextrina utilizado como sistema de libertação do fármaco. No entanto no design de fármacos com base em glúcidos é necessário ter em consideração algumas características destes compostos orgânicos, uma delas é a sua elevada polaridade. Moléculas muito polares não conseguem atravessar passivamente a camada

de enterócitos que reveste o intestino, pré-requisito necessário para fármacos de via oral, mesmo no sistema sistémico, administrado por via parental, os glúcidos são rapidamente eliminados por via renal (Ernst e Magnani, 2009; Klyosov et al, 2012).

Geralmente quanto maior for a lipofilicidade do fármaco maior é a absorção mas menor é a solubilidade nos fluidos gástrico e intestinal. Desta maneira um balanço entre lipofilicidade e hidrofiliicidade no desenvolvimento de fármacos com base em açúcares é crucial (Patrick, 2009).

Estrategicamente o design de derivados de glúcidos com grupos funcionais que aumentem a natureza lipofílica é uma mais valia, pois aumenta a biodisponibilidade e consequentemente os efeitos antineoplásicos (Carversesi e Hergenrother, 2014).

### **3. NOVAS TECNOLOGIAS NA ÁREA DA MEDICINA NUCLEAR UTILIZAM GLÚCIDOS**

Em 1920 dois cientistas, Otto Warburg e Herbert Crabtree trouxeram novos conhecimentos sobre o metabolismo das células cancerosas. Warburg realizou vários estudos sobre a respiração celular, inicialmente utilizou ratos para os seus estudos comparando a taxa de respiração celular entre ratos saudáveis e ratos com cancro (Koppenol et al, 2011; Hockenbery et al, 2013).

As suas experiências revelaram que os tecidos cancerígenos dos ratos doentes consumiam mais glicose do que os ratos saudáveis, havendo uma taxa glicolítica bastante elevada e ainda a presença de lactato nas células malignas. Warburg estendeu os seus resultados ao ser humano e concluiu que as células cancerígenas metabolizam a glicose pela via glicolítica anaeróbica mesmo em condições aeróbicas. Esta descoberta ficou conhecida como o “efeito de Warburg” e foi bem aceite pela comunidade científica tendo-lhe valido um prémio nobel em 1931 (Brand, 2010; Hockenbery et al, 2013).

Anos mais tarde em 1969 Peter Pedersen interessado no trabalho de Otto Warburg, desenvolveu vários trabalhos científicos na tentativa de perceber porque sucedia o efeito de Warburg nas células malignas, este cientista defende que o efeito de Warburg ocorre nas células cancerígenas porque as mitocôndrias apresentam uma capacidade reduzida de funcionamento e também por existir uma elevada atividade das enzimas hexocinases 2, levando consequentemente a uma alta taxa de glicólise que depois segue a via da fermentação em vez do ciclo de Krebs e cadeia respiratória nas mitocôndrias (Vendrell et al, 2011).

Para além disto, diversos estudos apontam que as células malignas apresentam uma taxa glicolítica mais elevada que as células normais, devido ao aumento da expressão dos transportadores de glicose na superfície destas células, os GLUTs (Aparicio et al, 2010).

É com base no efeito de Warburg que se desenvolveu um análogo de glucose associado a um composto radioactivo que permite diagnosticar tumores ainda com poucos milímetros (Hockenbery et al, 2013).

A combinação de PET e TAC é atualmente utilizada na área da medicina nuclear, no diagnóstico de tumores e doenças metabólicas, esta tecnologia permite identificar e

localizar tumores ainda em fase muito precoce, dando a possibilidade aos doentes de iniciarem o tratamento o mais rapidamente possível, evitando a evolução da doença (Robilotta, 2006).

A introdução da tomografia computadorizada (TC) deu-se em 1972, inicialmente denominada de tomografia axial computadorizada (TAC). Esta técnica consiste em passar um feixe de raios x de baixa intensidade em forma de leque em torno do paciente, as imagens são introduzidas no computador que por sua vez constrói uma imagem de secção transversal completa do corpo humano (Seeley et al, 2007).

O sistema combinado PET/CT, para além de permitir extrair uma imagem anatómica, fornece informações do ponto de vista metabólico (Seam et al, 2011)

Devido à meia-vida física extremamente curta dos emissores de positrões viáveis e ao alto custo de implantação e execução da tecnologia PET, só em 1990 é que esta tecnologia se fixou definitivamente nos países desenvolvidos (Robilotta, 2006).

O análogo à glicose marcado com um elemento radioactivo, inicialmente com  $^{14}\text{C}$  por Louis Sokoloff e a sua equipa e posteriormente com  $^{18}\text{F}$  por Tatuio Ido e colaboradores, resulta num radiofármaco específico para doenças oncológicas, designado por flúor deoxi-glicose ou FDG (Robilotta, 2006).

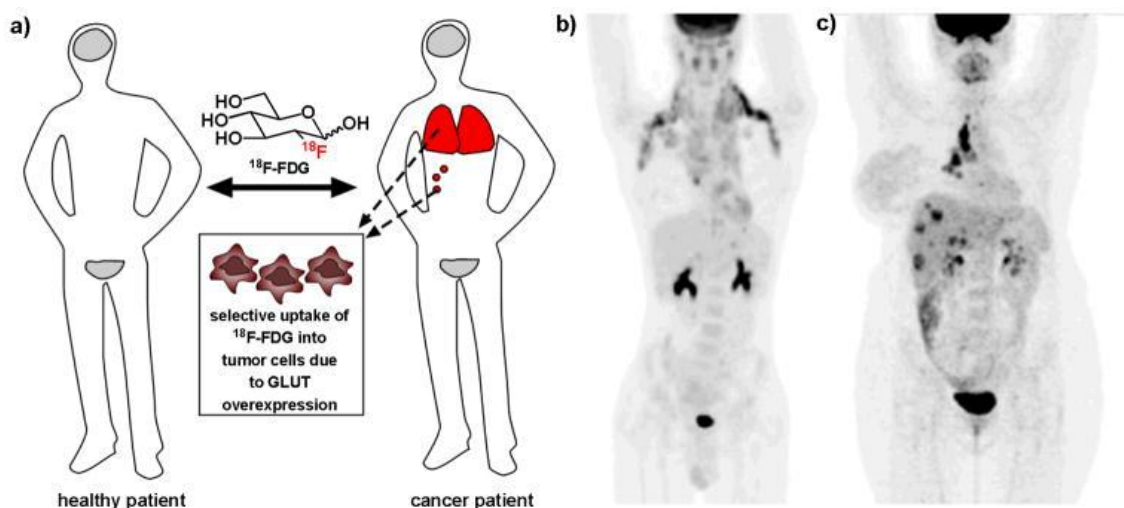
O FDG é injetado no corpo e é reconhecido pelo organismo como glicose sendo distribuído por todo o corpo. A glicose irá acumular-se em maior quantidade nas células mais ativas e que requerem assim mais energia para desempenhar as suas funções (Ahn et al, 2014).

As células cancerígenas, uma vez que estão em constante divisão necessitam de bastante energia e como também não seguem o processo normal da respiração celular, por cada molécula de glicose em vez de gerar 36 ou 38 ATPs, gera apenas 2 ATPs pela via da fermentação, necessitando de muita glicose para compensar. Esta diferença no consumo de glicose permite identificar um possível tumor (Aparicio et al, 2010).

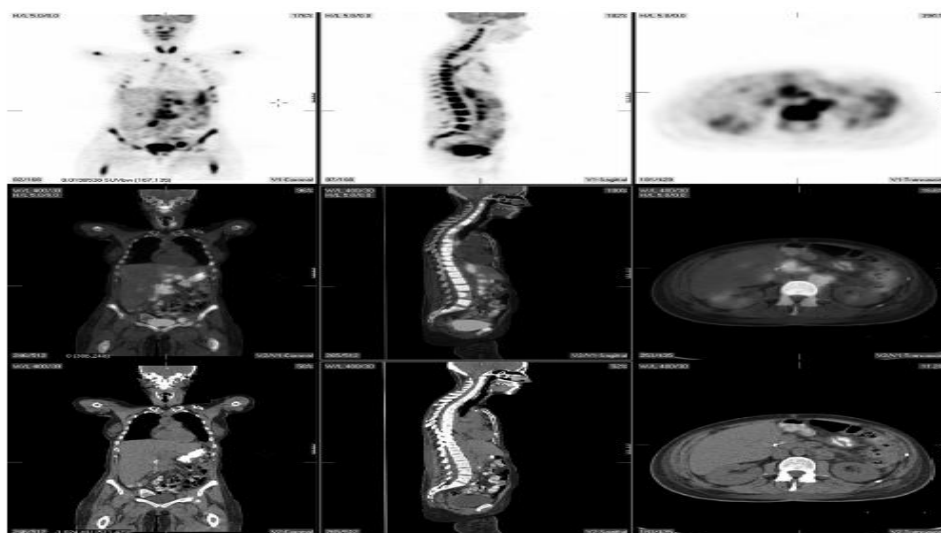
O FDG é transportado para dentro das células e fosforilado de maneira similar à glicose natural, no entanto o FDG fosforilado ou seja o FDG-6-fosfato não é um substrato da enzima glicose-6-fosfato-isomerase, e assim este composto acaba por ficar retido na

célula atingindo um estado de equilíbrio próximo a cerca de 60 minutos após a injeção (Seam et al, 2011).

O elemento radioactivo decai e os positrões ficam livres para interagir com os electrões ao redor. As cargas opostas aniquilam-se e a emissão da radiação sob forma de fotões é detetada pelo scanner PET (Seam et al, 2011).



**Figura 1:** Representação de um pet/tac com FDG num indivíduo com linfoma de Hodgkin. a) num indivíduo saudável, o FDG é captado maioritariamente pelo cérebro e bexiga, enquanto que no indivíduo com cancro, as células cancerígenas são as células que mais consomem glucose, o FDG está representado a vermelho; b) mostra o  $^{18}\text{F}$  FDG PET de um indivíduo com linfoma de Hodgkin; c) representa uma mulher com cancro da mama. Adaptado de: Calvaresi e Hergenrother, 2012.



**Figura 2:** Representação de um pet/tac de um paciente do sexo feminino de 48 anos com linfoma de Burkitt. A imagem revela que há um consumo muito ativo na medula óssea e estende-se até ao ilíaco,

ambos os lobos da tiroide e o fígado também estão afetados, existindo já uma metastização do cancro.  
Adaptado de: Seam et al, 2011.

#### **4. VÁRIAS LINHAS DE TRATAMENTO NO CANCRO**

O açúcar é a principal fonte de energia usada pelos animais, no entanto uma vez que a membrana celular é impermeável a moléculas polares, para que o açúcar entre na célula é necessário haver proteínas transportadoras (Aparicio et al, 2010).

Existem duas famílias de transportadores de açúcar, os GLUTs (solute carrier family2) é um tipo de transporte facilitado e portanto sem gasto de energia e os SGLT (solute carrier family 5) é um co-transportador de sódio/glucose e requer energia (Machado, 1998).

Dentro da família GLUT existem diferentes tipos de transportadores que partilham uma sequência homóloga entre eles, mas afinidade para os açúcares é diferente e a sua expressão nos diferentes tecidos também difere, por exemplo os GLUT1s são mais abundantes no tecido eritrocitário, os GLUT2s no fígado, os GLUTs3 no cérebro e os GLUTs4 são transportadores sensíveis à insulina e estão expressos em tecidos com elevada sensibilidade à insulina. Consoante o tipo de transportador os substratos podem ser a glucose e a frutose, sendo a glucose a mais comum (Machada et al, 2005).

Como já foi referido anteriormente as células cancerígenas utilizam a via glicolítica para a degradação da glicose devido a possíveis anomalias no mitocôndrias que impedem o catabolismo oxidativo e como o processo fermentativo requer mais glicose para produzir a mesma quantidade de energia que o processo oxidativo, as células cancerígenas requerem um consumo maior de glicose (López-lázaro, 2008).

Estudos demonstraram também que há um aumento da atividade das enzimas glicolíticas, principalmente a enzima hexocinase, que fosforila a glucose permitindo desta forma manter o gradiente transmembranar e evitando que a glucose saia da célula (Koppenol et al, 2011).

O aumento da expressão de recetores GLUTs também é uma condição característica das células cancerígenas e parece haver uma relação entre o nível de expressão destes recetores com a gravidade do cancro. A desregulação da expressão destes recetores advém da mutação da proteína p53 que é uma das proteínas mais importantes na supressão do tumor promovendo a apoptose nas células com anomalias. Esta proteína também é capaz de reprimir a transcrição da GLUT1 e GLUT4. Outros fatores de



sinalização também estão implicados no controle da expressão dos transportadores (Macheda et al., 2005)

O aumento do consumo de glicose pelas células cancerígenas permite-lhes estar em contínua divisão, uma vez que gastam bastante energia neste processo. Com base neste fato vários são os alvos atrativos para o desenvolvimento de novos fármacos anticancerígenos. Alguns cientistas procuram desenvolver fármacos que impeçam as células cancerígenas de se alimentarem de glicose bloqueando os fatores que alteram a expressão dos GLUTs ou inibindo as enzimas glicolíticas. No entanto, estas ideias são pouco plausíveis devido a sua falta de especificidade, pois atingem qualquer célula. A produção de um análogo da glicose mas não metabolizável, é considerada uma opção bastante válida uma vez que as células cancerígenas usam primeiramente a glucose enquanto as restantes células podem utilizar outros açúcares (Aparicio et al, 2010).

O agente 2-Deoxi-D-glucose, é um derivado de açúcar promissor para impedir o metabolismo da glucose, este análogo de glucose é toxico para certas células cancerígenas mesmo em dosagens baixas. O seu mecanismo de ação inclui depleção da energia celular, aumento do stress oxidativo e indução da autofagia. Este possível fármaco apresenta uma desvantagem que é ser pouco eficaz em monoterapia. Estudos estão a ser efetuados para associar este composto a fármacos anticancerígenos existentes (Zhang et al., 2014).

Outra estratégia em fase de estudo consiste em bloquear as proteínas transportadoras. Esta ideia é interessante para alguns investigadores, que têm-se dedicado ao design de várias moléculas que consigam inibir os diferentes tipos de proteínas transportadoras de açúcar. Esta estratégia poderia ser usada para o tratamento de tumores que apresentam tipos de transportadores específicos e onde a sua expressão é anormal. No entanto nenhuma destas estratégias apresenta atualmente resultados credíveis.(Chen, 2012).

As terapêuticas correntes não foram desenhadas para diminuir o consumo de açúcar pelas células cancerígenas. No entanto este efeito é alcançado como efeito secundário através de alguns fármacos como por exemplo o sunitinib, com excelentes resultados devido ao seu efeito antiangiogenico, a diminuição da vasculatura dos tumores diminui o aporte de açúcar, impedindo a sua divisão e o tumor acaba por degenerar.(Aparicio et al, 2010).

#### **4.1. Açúcares como ligandos para direcionar fármacos**

Para além da área das GLUTs e alvos baseados no efeito de warburg, existem outras estratégias a serem investigadas como é o caso da terapêutica direcionada no qual fármacos anticancerígenos estão confinados a nanopartículas ou nanofármacos (Lima et al, 2012).

Apesar dos fármacos convencionais para o cancro serem eficazes, existem vários problemas inerentes, como a libertação rápida do agente e consequentemente a seu tempo reduzido de ação terapêutica. Outro grande problema que já foi referido ao longo do trabalho é a falta de especificidade acabando por danificar células saudáveis. Devido à reduzida especificidade, para aumentar a biodisponibilidade no local do tumor é necessário aumentar a dose e consequentemente os efeitos adversos são maiores (Ananthula, 2014).

A terapêutica direcionada veio resolver problemas relacionados com especificidade e disponibilidade. Esta terapêutica pode ser passiva ou ativa. A transformação destes fármacos em pró-fármacos poliméricos conjugados reduz a toxicidade sistémica, aumenta o índice terapêutico e ainda aumenta o direcionamento do fármaco para o sítio-alvo através do efeito aumentado de permeabilidade e retenção (Jong, 2008).

O efeito de permeabilidade e retenção está relacionado com a capacidade de que certas moléculas de determinado tamanho têm em acumular-se nos tecidos tumorais, mais do que nos tecidos normais, como é o caso de nanopartículas, lipossomas e fármacos macromoleculares (Kobayashi et al, 2014).

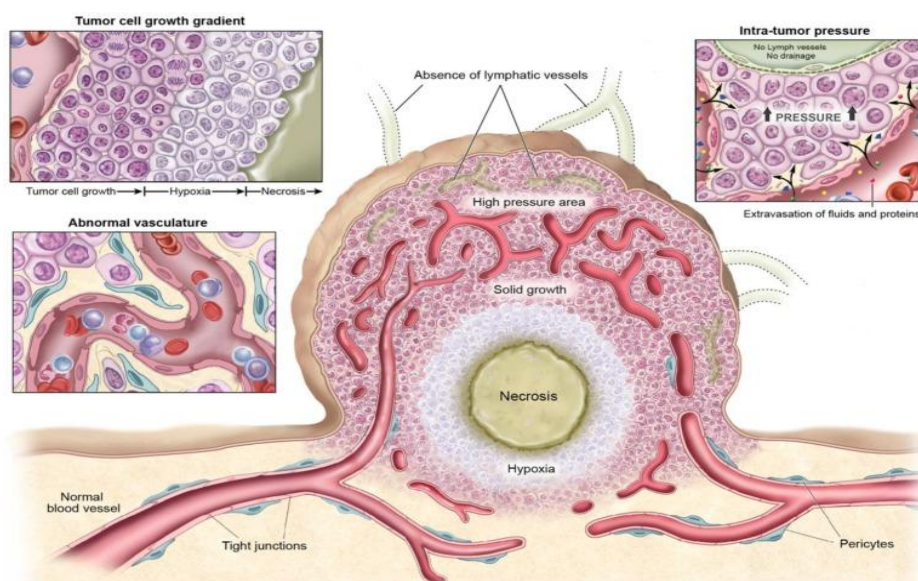
Os fármacos de baixo peso molecular nos tecidos saudáveis ou normais, circulam através de uma rede vascular bem organizada, começando nas artérias, seguido das arteríolas e acabando nos capilares, os quais atravessam a partir de pequenos poros que existem entre as células para os tecidos. Estes poros possuem aproximadamente entre 5 a 10nm de diâmetro deixando escapar moléculas de fármaco livres com determinado tamanho mas impedindo as proteínas do plasma de atravessarem. O fármaco é distribuído homogeneamente entre os tecidos de acordo com o gradiente de concentração (Rajor et al, 2014; Kobayashi et al, 2014).

Nos tecidos tumorais existe necessidade de uma formação rápida de novos vasos que se estendem a partir de vasos sanguíneos já existentes para que o aporte de oxigénio e

nutrientes seja assegurado. No entanto durante a síntese dos novos vasos existe um desequilíbrio entre fatores pro e anti-angiogênicos nas diferentes partes do tumor criando uma rede vascular desorganizada, tortuosa e dilatada (Yin et al, 2014)

Nos vasos dos tumores não existe hierarquia, pois não há distinção entre os vasos. Em consequência o fluxo de sangue no tumor é heterogêneo que acaba por interferir também na distribuição do fármaco. Nos vasos normais as células que constituem o endotélio são coesas enquanto nos vasos tumorais o endotélio apresenta muitas lacunas entre as células e descontinuidade dos vasos, permitindo a passagem de macromoléculas para o tumor e consequentemente um aumento da pressão intersticial. Este fator juntamente com a falta de drenagem linfática característica dos tumores agrava também a hipertensão intersticial (Munson e Shieh, 2014).

Na terapêutica direcionada passiva os nanofármacos são acumulados nos tumores sólidos porque as fenestrações dos neovasos são bem maiores, com tamanho entre 100 a 780nm. Desta forma os nanofármacos com tamanho médio de 200nm conseguem escapar nas fenestrações mais largas dos neovasos dos tumores provocando uma maior acumulação de fármaco no sítio do tumor do que nos tecidos saudáveis e a drenagem linfática deficiente permite que o fármaco fique mais tempo retido, todo este mecanismo é designado de efeito de retenção e permeabilidade aumentada (enhanced permeability and retention-EPR) (Shohdy e Alfaar, 2013).



**Figura 3:** Representação das características fisiológicas do tecido tumoral e vasculares que facilitam a entrada do fármaco no tumor. Adaptado de: Kobayashi et al, 2014.

Diversas moléculas transportadoras têm sido utilizadas para direcionar os fármacos antineoplásicos aos sítios de tumores como por exemplo o PEG (polietilínoglicol), PGA (ácido poliglutamico) e o copolímero HPMA. Estes transportadores melhoram significativamente a farmacocinética do fármaco e consequentemente a sua biodisponibilidade e eficácia. Uma vez que só o PGE é biodegradável, o PGA e HPMA foram limitados entre 40 a 45 kDa de modo a poderem ser eliminados via renal (Feng, 2010).

O copolímero HPMA conjugado, é uma molécula biocompatível, não imunogénica, não tóxica e solúvel em água. Atualmente existe um número de HPMA conjugados com fármacos disponíveis para o tratamento do cancro e muitos outros estão a ser desenvolvidos para que se possam utilizar no futuro (Feng, 2010).

A conjugação de pequenas moléculas terapêuticas com HPMA confere muitas vantagens como o aumento da solubilidade, fácil conjugação com diversos fármacos, aumento da biodisponibilidade perto dos tumores reduzindo a toxicidade sistémica devido ao efeito de permeabilidade e retenção e consequentemente aumento da eficácia terapêutica (Duncan, 2006; A. David, 2010).

Em relação à terapêutica direcionada ativa, as nanopartículas ou nanofármacos são conjugados com ligandos, cujos recetores só existem ou só são expressos na sua maioria nas células tumorais o que permite que o fármaco seja libertado no tumor e não nos tecidos saudáveis (Kopeckova, 2001).

Durante muitos anos investigou-se um número de ligandos alvo desenhados para associar ao copolímero HPMA, como as lectinas, péptidos e anticorpos. Só recentemente os glúcidos começaram a ganhar especial interesse, uma vez que o seu conhecimento está mais aprofundado e sabe-se que desempenham funções importantes no reconhecimento de uma grande variedade de moléculas como as toxinas, lectinas, vírus, enzimas, hormonas e bactérias (A. David, 2010).

A exploração de glúcidos como forma de alcançar o alvo terapêutico tem sido estudada desde de 1990, tendo a maior parte das estratégias sido direcionada para o reconhecimento das lectinas endógenas expressas na superfície das células (Carveresi e Hergenrother, 2014).

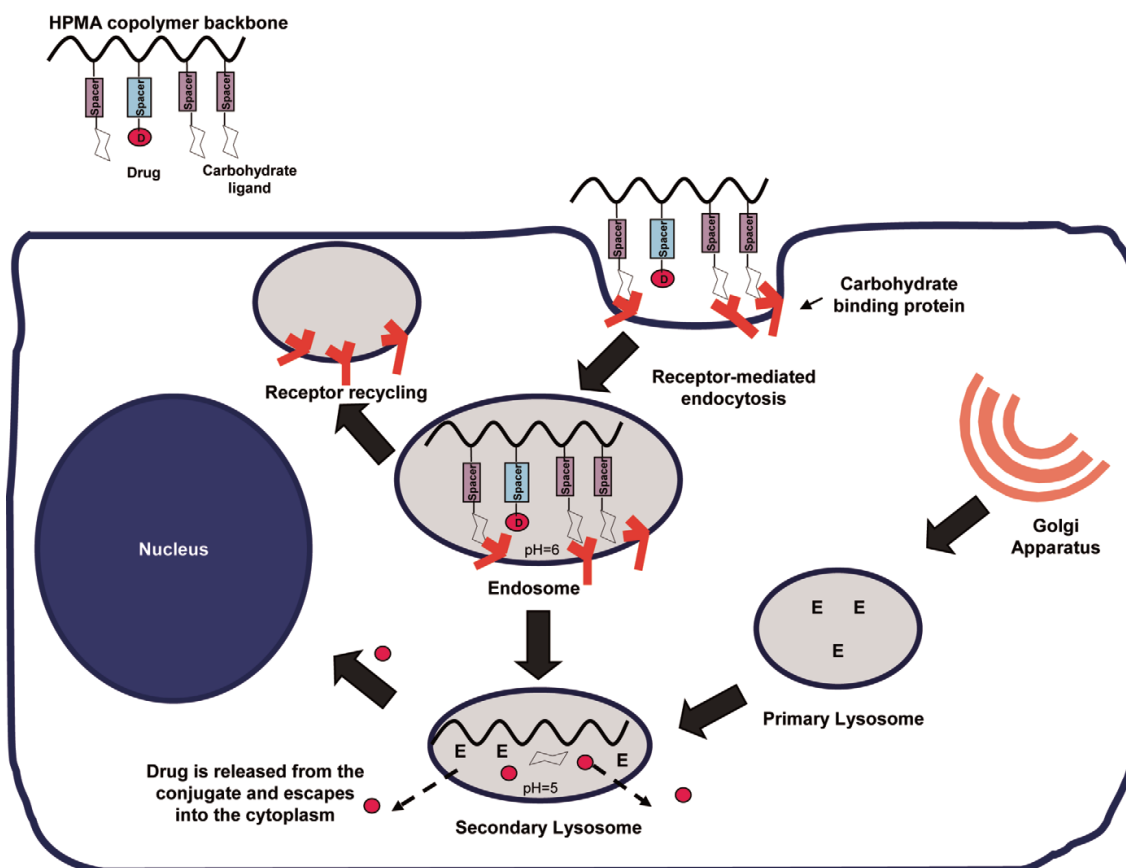
As lectinas endógenas como já foi referido na parte da importância dos glúcidos nos sistemas biológicos, são uma classe de glicoproteínas que possuem sítios específicos de ligação não covalentes a glúcidos definidos. Estas lectinas podem ser encontradas em muitos tecidos tanto saudáveis como patológicos e desempenham funções fisiológicas importantes conforme descrito anteriormente no trabalho. Nas células tumorais existe uma elevada expressão destas glicoproteínas e vários estudos revelam que existe uma relação entre o seu nível de expressão com o crescimento do tumor e potencial para a metastização (Kayser et al, 2003; Gupta et al, 2009).

Têm sido investigadas propriedades farmacológicas do HPMA conjugado com vários tipos de glúcidos para alcançar diferentes lectinas endógenas nomeadamente asialoglicoproteínas (ASGP-R), galectinas 1 e 3, selectinas e recetores de manose (Gupta et al, 2009; Minko et al, 2004).

Os recetores ASGP-R são muito atrativos como alvos terapêuticos, pois são recetores endocíticos recicláveis encontrados nas células hepáticas e reconhecem especificamente os glúcidos  $\beta$ -galactose ou N-acetilgalactosamina que se encontram nas glicoproteínas circulantes ou nas células (A. David, 2010).

Como a afinidade dos glúcidos aos recetores proteicos é muito fraca, as dissociações entre o ligando e o recetor são muito frequentes. Uma maneira de ultrapassar esta situação consiste em criar múltiplos grupos ligandos para poderem simultaneamente ligar-se a mais do que um recetor ou aos CRDs todos expostos pelo recetor, uma vez que o ASGP-R apresenta mais do que um CRD (Kovar et al, 2010).

O fármaco anti-cancerígeno e vários ligandos glucídicos são ligados ao copolímero transportador HPMA por um agente espaçante. A existência de agente espaçante geralmente um oligopeptido, permite que o fármaco seja libertado apenas intracelularmente, pois é bastante estável no plasma mas é rapidamente clivado dentro da célula pelas enzimas lisossomais (Borgman et al, 2010).



**Figura 4:** Representação esquemática do que acontece num HPMA conjugado quando chega a célula alvo. Primeiramente a porção glucídica reconhece o recetor, seguidamente ocorre a internalização do recetor ligado ao HPMA conjugado formando um endossoma que se funde posteriormente ao lisossoma secundário que contem enzimas digestivas, o pH é mais baixo aproximadamente de 5, criando-se as condições necessárias para a hidrólise das ligações peptídicas, o fármaco é então libertado e dirige-se para o alvo onde irá exercer a sua função citotóxica. Adaptado de: David, 2010.

O copolímero HPMA-DOX-Gal foi o primeiro polímero glicosilado a ser testado no ser humano. O conjugado continha Glicina-fenilalanina-leucina-glicina como espaçador. Os ensaios foram realizados em pacientes com carcinoma hepatocelular no qual num determinado grupo foi administrado DOX livre, noutro o HPMA-DOX e por fim, no último grupo com HPMA-DOX-Gal. Para melhorar a afinidade para o recetor, foi incorporado mais do que uma molécula de galactose. Os resultados foram promissores para o HPMA-DOX-Gal pois apresentou maior tempo de semivida no plasma em relação a DOX livre e também menos efeitos adversos. Em comparação com o HPMA-DOX, o HPMA-DOX-Gal mostrou ser mais ativo uma vez que a galactose o torna mais seletivo (Duncan, 2009).

Existem contudo alguns problemas ainda por ultrapassar antes de os copolímeros conjugados com glúcidos serem aprovados para o uso clínico. Primeiro é difícil a obtenção de oligossacáridos naturais purificados como ligandos alvo e a síntese de moléculas com base em glúcidos depende de um conjunto de procedimentos e técnicas complexas. Outro problema é o fato dos recetores para ligandos glucídicos estarem expressos tanto nas células cancerígenas como nas células normais e portanto o fármaco continua atingir as células saudáveis (A. David, 2010).

Outro alvo terapêutico são as galectinas que, como já foi referido são lectinas que possuem afinidade para os resíduos D-galactose. Estes recetores estão expressos em grande quantidade em alguns tipos de cancro e parecem estar envolvidos em processos de inflamação, angiogenese, resposta imunitária e migração das células cancerígenas. Muitos compostos têm sido sintetizados para bloquear as interações entre as galectinas e os glúcidos, principalmente inibidores das galectinas 1 e 3 (Sorme et al, 2002; Ege et al, 2010; Laurent e Dimitroff, 2012).

Anna Tevyashova et al, nas suas experiências alongou o grupo glucídico da doxorrubicina com D-Galactose. O composto obteve a designação de Doxo-Galactose e demonstrou numa experiência efetuada com ratinhos com leucemia ser menos tóxica e mais eficaz em comparação com a doxorrubicina não conjugada (Klyosov, 2014).

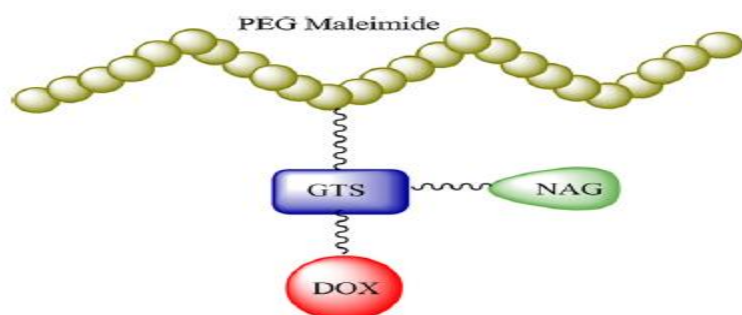
Outro derivado da doxorrubicina foi testado, a doxorrubicina conjugada com um polissacárido linear, galactomanano, cujo nome comercial é DAVANAT ou GM-CT-01. O galactomanano é extraído das sementes da planta *Cyamopsis tetragonoloba* e é constituído por moléculas de manose e galactose. Este composto interage com a galectina-1, ligando-se ao longo de uma área relativamente grande, impedindo que o ligando natural se ligue e exerça a sua função. O DOX-DAVANAT ainda não foi aprovado pela FDA, encontrando-se atualmente na fase 2 de ensaios clínicos em pacientes com cancro colorectal (Miller et al, 2009).

Apesar da maioria das estratégias na terapêutica direcionada ter como alvo as lectinas endógenas, existem outros recetores de interesse como é o caso dos recetores para o NAG (N-acetil-glucosamina)(Cai et al, 2010).

O NAG é um potente candidato como ligando para direccionar os fármacos aos tumores porque as células tumorais apresentam elevado número de recetores para NAGs. Como

o NAG é um açúcar muito solúvel em água, ao conjugar com um copolímero existe um aumento geral da solubilidade e da capacidade de internalização celular (Pawar, 2012).

Pawar et al, conjugaram a doxorrubicina com o sistema de libertação PEG (polietilenoglicol) para melhorar a farmacocinética, o NAG como ligando e a glutatona como espaçador. A glutatona apresenta grupos funcionais diferentes, um grupo tiol, uma amida e dois grupos carboxilos que lhe permitem desta maneira conjugar com diferentes compostos, neste caso para conjugar com o PEG, DOX e NAG respetivamente.



**Figura 5:** Representação esquemática do pró-fármaco conjugado com o polímero PEG, o NAG, glutatona e o fármaco doxorrubicina (Pawar et al., 2012)

Segundo estes autores o NAG liga-se ao recetor NAG expressos maioritariamente nas células tumorais seguindo a internalização de todo o complexo polímero-recetor, através da endocitose. A comparação *in vitro* da citotoxicidade entre a doxorrubicina livre e o PEG glicosilado utilizando como método de avaliação a microscopia confocal demonstra que existe uma maior concentração do fármaco conjugado do que o fármaco livre nas células tumorais.

O fármaco livre é internalizado na célula por difusão simples mas o polímero conjugado de elevado peso molecular é internalizado por endocitose. Este processo é mais lento e requer uma maior concentração de fármaco para atravessar a membrana plasmática. No entanto o processo pode ser acelerado ao adicionar um grupo ligando cujo recetor se encontre muito expresso nas células cancerígenas. Desta maneira o mecanismo de internalização em vez de ser pelo processo de endocitose simples ocorre pela endocitose mediado por recetor e aumenta também a permeabilidade celular resultando num aumento da citotoxicidade do pró-fármaco (Davis e Robinson, 2002)



Outra estratégia que tem sido bastante investigada pelos cientistas consiste em inibir as glicosiltransferases. Como foi já referido ao longo do trabalho, existe uma glicosilação anormal nas células cancerígenas, havendo um excesso de alguns epítomos como o sLe<sup>x</sup>. Alterações da expressão de alguns epítomos parecem estar relacionados com a progressão do tumor e metastização. Os resíduos de fucose e ácidos siálicos, são dois açúcares que fazem parte da maioria dos epítomos (Kritzer et al, 2005). Neste trabalho irei focar mais sobre o design de derivados de glúcidos inibidores das fucosiltransferases.

## **5. ENZIMAS FUCOSILTRANSFERASES E FUCOSIDASES**

### **5.1. Funções da L-fucose**

A L-fucose é uma 6-deoxi-L-galactose, distinguindo-se dos outros monossacáridos de seis carbonos por ter falta de um grupo hidroxilo no carbono 6 e pela sua configuração L. É considerado o açúcar mais lipofílico. Tanto a fucose como os ácidos siálicos são componentes comuns dos N e O-glicanos e dos glicolípidos e estão posicionados frequentemente nos terminais dos glicoconjugados da superfície das células (Becker e Lowe, 2003).

A fucosilação e a sialilação dos glicanos dos recetores, desempenham importantes papéis biológicos. Estão implicados por exemplo nas interações patogénico-hospedeiro, sinalização celular e migração dos leucócitos (Rillahan et al, 2012).

A fucose entra na constituição do tetrassacárido siali Lewis (NeuAc alfa2-3Gal beta1-4 (Fuc alfa1-3)-GlcNAc) abreviado sLe<sup>x</sup>. Este tetrassacarido é muito conhecido pela sua importância fisiológica, por exemplo, no recrutamento de leucócitos quando existe uma lesão ou inflamação, os sLe<sup>x</sup> expressos na superfície dos leucócitos reconhecem e ligam-se às selectinas P e E expressas na superfície das células endoteliais ativadas, ocorrendo de seguida a extravasão dos leucócitos para os tecidos, provocando inflamação. Novos fármacos que mimetizam estes açúcares para impedir a interação entre as selectinas e os sLe<sup>x</sup>, estão a ser desenvolvidos como anti-inflamatórios para o tratamento de doenças inflamatórias crónicas como a artrite reumatoide e a psoríase (Norman et al, 1998).

Os sLe<sup>x</sup> são também fundamentais no processo de fertilização, pois encontram-se em abundancia na superfície dos oócitos permitindo a ligação com os espermatozoides (Clark, 2014).

Os resíduos de fucose fazem parte também dos antígenos H que se encontram nos precursores dos eritrócitos. A fucose é adicionada ao resíduo terminal de galactose formando um trissacárido (fucα2Galβ4GlcNAc) que está ligado por sua vez a um grupo R que pode ser uma proteína ou um lípido. A transferência de um resíduo de N-acetilgalactosamina forma um tetrassacárido que se define como antígeno A. As pessoas do grupo sanguíneo do tipo B possuem uma enzima diferente específica para a transferência de galactose formando um tetrassacarido diferente do A. O sistema

imunitário é capaz de distinguir estas pequenas diferenças provocando uma reação de rejeição quando existem transfusões de sangue de grupos sanguíneos incompatíveis. O antígeno H não modificado é expresso nas células do tipo O (Mak e Saunders, 2011).

Os antígenos Lewis<sup>b</sup> (Gal $\beta$ 1,3GlcNAc) expressos nas células do epitélio gástrico contêm resíduos de fucose ligados via  $\alpha$ (1,2) e  $\alpha$ (1,4). A *Helicobacter pylori* liga-se aos antígenos Le<sup>b</sup> e inicia a sua infeção podendo desencadear uma úlcera péptica. (Aguilar et al, 2002; Liu et al, 2009).

Existem também evidências da influência dos glicanos fucosilados no desenvolvimento embrionário, principalmente na neurogênese. Epítopos de Lewis<sup>x</sup> foram encontrados em diversas áreas do tecido cerebral embrionário. Embora ainda se desconheça o seu mecanismo de ação, existe uma elevada expressão deste epítipo nos vários estádios de desenvolvimento embrionário o que leva os cientistas a crerem que o antígeno é crucial para a neurogênese (Shimoda et al., 2002).

Os exemplos de antígenos apresentados são apenas alguns dos muitos açúcares fucosilados que se encontram nas terminações das glicoproteínas e glicolípidos.

## 5.2.Fucosiltransferases e fucosidases

Fucosiltransferases e fucosidases são as enzimas responsáveis pela adição e remoção, respetivamente, dos resíduos de fucose aos glicanos (Otero-estévez et al, 2013).

A  $\alpha$ -L-fucosidase, é uma enzima que pertence à classe das hidrolases, esta enzima codificada pelo gene FUCA1, remove resíduos de L-fucose que se encontram maioritariamente ligados aos terminais não reduzidos dos glicanos. As  $\alpha$ -L-fucosidases localizam-se nos lisossomas, onde promovem juntamente com outras hidrolases a degradação dos recetores ou antígenos da superfície da célula (Otero-estévez et al, 2013).

A alteração da atividade alfa-L-fucosidase está associada a muitas desordens no metabolismo podendo conduzir à inflamação, cancro, fibrose cística e fucosidose (Tu et al, 2013).

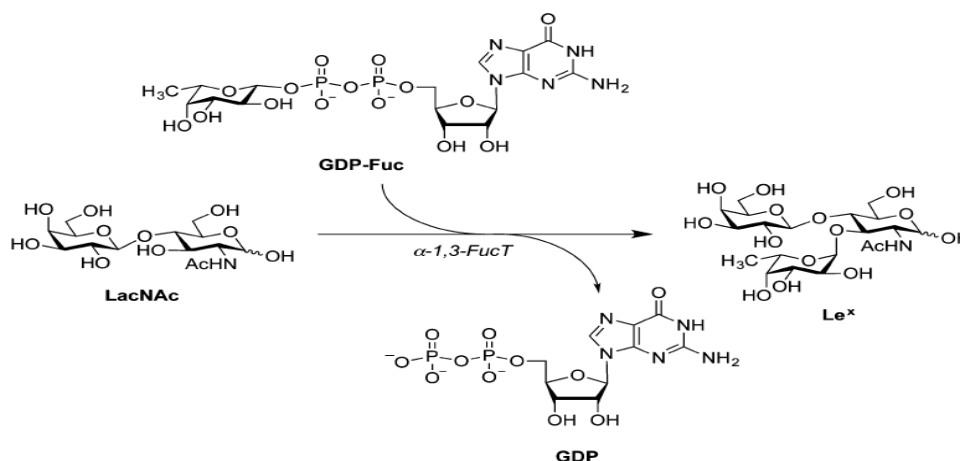
Existem informações da estrutura tridimensional da  $\alpha$ -L-fucosidase da *Thermogota* marítima, *B. thetaiotaomicron* e *Bifidobacterium*, no entanto de mamíferos ainda é desconhecida. (Wright et al, 2013).

As fucosiltransefrases, são enzimas que pertencem à grande família de glicosiltransferases, encontrando-se na sua grande maioria no aparelho de Golgi e catalisam a transferência de um resíduo de L-fucose de um substrato dador, a guanosina difosfato  $\beta$ -L-fucose (GDP-Fuc) para os oligossacáridos dos glicoconjugados. Segundo a CAZY, as FUCTs estão extensamente expressas desde bactérias e plantas aos invertebrados e vertebrados ( Vries et al, 2001).

Todas as fucosiltransferases apresentam especificidade para o mesmo substrato dador, a fucose-GDP, e portanto o sitio ativo ao qual o substrato se liga deve ser semelhante para todos os tipos de fucosiltransferases, a diferença reside no reconhecimento do substrato aceitador e no tipo de ligação glicosídica formada (Vries et al, 2001).

As FucTs são classificadas de acordo com o tipo de ligação glicosídica formada, assim existem as  $\alpha$ -1,2;  $\alpha$ -1,3/4,  $\alpha$ -1,6 e *O*-FucTs. Fucosilações  $\alpha$ -1,2 e  $\alpha$ -1,3/4, geralmente ocorrem na posição terminal dos oligossacaridos, enquanto na  $\alpha$ -1,6 e na *O*-fucosilação ocorrem na zona mais interna das glicoproteínas ( Breton et al, 1998; Tu et al, 2013).

Os genes *fut1* e *fut2* codificam as  $\alpha$ -1,2-FucTs, as enzimas FucT-I e FucT-II respetivamente e catalisam a transferência de fucose para o residuo galactose da N-acetilactosamina (LacNAc) via  $\alpha$ -1,2. Embora o tipo de ligação seja a mesma, estas enzimas possuem especificidade para diferentes substratos aceitadores. A FucT-I possui afinidade para o açúcar tipo I (Gal $\beta$ 1,3GlcNAc) e tipo II (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc). A FucT-II prefere tipo I e tipo III (Gal $\beta$ 1,3GalNAc) (Breton et al, 1998; Nicholas Pettit et al, 2012).



**Figura 6:** Representação esquemática da fucosilação catalisada pela  $\alpha$ -1,3-fucosiltransferase. A enzima catalisa a transferência de uma L-fucose de um substrato doador para um substrato aceitador N-acetil-lactosamina com formação de um trissacárido Lewis x ( $Le^x$ ) e GDP. Adaptado de: Tu et al, 2013.

Os genes *fut 3,4,5,6,7* e o *fut9* codificam seis enzimas  $\alpha$ -1,3 FucTs (FucT-III,IV,V,VI,VII e FucT-IX). A FucT-III e FucT-V possuem ainda a capacidade para ligações  $\alpha$ -1,4, adicionando L-fucose aos substratos aceptadores tipo I e tipo II. As enzimas  $\alpha$ -1,2;  $\alpha$ -1,3/4 são responsáveis pelo último passo na síntese dos antígenos de Lewis como  $Le^x$ ,  $Le^y$ ,  $Le^a$ ,  $Le^b$ ,  $sLe^x$  e  $sLe^a$ . FucT-III, V e VI podem reconhecer açúcares sialilados (NeuAc) e não sialilados. FucT-IV e FucT-IX preferem o açúcar não sialilado tipo II LacNAc, enquanto o VII prefere o açúcar sialilado tipo II (Kimura et al, 1997; Ma et al, 2006).

<u>Type II Series</u>		<u>Type I Series</u>	
<b>Type II (LacNAc)</b>	Gal $\beta$ 1,4GlcNAc	<b>Type I</b>	Gal $\beta$ 1,3GlcNAc
<b>Le<sup>s</sup></b>	Gal $\beta$ 1,4GlcNAc   $\alpha$ 1,3 Fuc	<b>Le<sup>a</sup></b>	Gal $\beta$ 1,3GlcNAc   $\alpha$ 1,4 Fuc
<b>H-Type II</b>	Gal $\beta$ 1,4GlcNAc   $\alpha$ 1,2 Fuc	<b>H-Type I (H Antigen)</b>	Gal $\beta$ 1,3GlcNAc   $\alpha$ 1,2 Fuc
<b>Le<sup>x</sup></b>	Gal $\beta$ 1,4GlcNAc   $\alpha$ 1,2   $\alpha$ 1,3 Fuc Fuc	<b>Le<sup>b</sup></b>	Gal $\beta$ 1,3GlcNAc   $\alpha$ 1,2   $\alpha$ 1,4 Fuc Fuc
<b>Sialyl-Le<sup>x</sup></b>	Gal $\beta$ 1,4GlcNAc   $\alpha$ 2,3   $\alpha$ 1,3 sialic acid Fuc	<b>Sialyl-Le<sup>a</sup></b>	Gal $\beta$ 1,3GlcNAc   $\alpha$ 2,3   $\alpha$ 1,4 sialic acid Fuc
		<b>A-blood antigen</b>	GalNAc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Gal $\beta$ 1,3GlcNAc   $\alpha$ 1,2 Fuc
		<b>B-blood antigen</b>	Gal $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Gal $\beta$ 1,3GlcNAc   $\alpha$ 1,2 Fuc

**Figura 7:** Estruturas de antígenos de Lewis fucosilados pelas enzimas  $\alpha$ -1,2 e  $\alpha$ -1,3- fucosiltransferases. A sublinhado estão os açúcares tipo II e tipo I. Adaptado de: Ma et al, 2006.

O gene *fut8* codifica a enzima FucT-VIII, a única enzima responsável pela  $\alpha$ -1,6-fucosilação. A FucT-VIII, ao contrário das outras enzimas que promovem a fucosilação nas posições terminais dos glicanos, fucosila regiões mais internas dos N-glicanos, transferindo L-fucose para as N-acetil-glucosaminas mais profundas dos N-glicanos (Ma et al, 2006).

Estas enzimas encontram-se amplamente expressas nos tecidos de mamíferos e os seus produtos, oligossacáridos com núcleos fucosilados são encontrados em muitas glicoproteínas de diversos tecidos principalmente do tecido cerebral (Ihara et al, 2006; Muinelo-Romay et al, 2008).

A estrutura cristalina da  $\alpha$ -1,6-fucosiltransferase foi determinada pela primeira vez por Brzezinski, Dauter et al, 2011 da *Bradyrhizobium* sp., uma bactéria Gram-negativa do solo que fixa nitrogénio (Brzezinski et al, 2012).

A presença de fucose nos N-glicanos desempenha importantes papéis no enrolamento das proteínas e estabilidade das glicoproteínas. (Muinelo-Romay et al, 2008).

As *O*-FucTs transferem resíduos de fucose diretamente para os resíduos de aminoácidos, serina ou treonina da glicoproteína (Schuster-Gossler et al, 2009).

Existem dois tipos de *O*-FucTs, a PO-FucT-I e a PO-FucT-II codificadas pelos genes *fut12* e *fut13* respetivamente. Estas enzimas residem no reticulo endoplasmático ao contrário da maior parte das glicosiltransferases que se localizam no complexo de Golgi (Schuster-Gossler et al, 2009).

A *O*-fucosilação das proteínas é essencial para o enrolamento de proteínas alvo e no papel destas proteínas-alvo no desenvolvimento embrionário e homeostase do tecido adulto (Lira-Navarrete et al, 2011).

Navarrete e sua equipa foram os primeiros investigadores a descrever a estrutura cristalina da PO-FucT-I sozinha e também na forma de complexo com o GDP-fuc (Lira-Navarrete et al, 2011).

Linkage	FucTs	Tissue distribution	Substrates	Products
$\alpha$ -1,2-	FucT-I	Erythrocyte membrane, vascular endothelium	Type I and II	H-type I (H-antigen) & H-type II, B-blood group antigen, Le <sup>y</sup>
$\alpha$ -1,2-	FucT-II	Epithelial cells, body fluids	Type I and III	H-type I (H-antigen), A-blood group antigen
$\alpha$ -1,3-	FucT-III	Milk, kidney, colon	(Sialyl) type I and II, fucosyl type I and II	(s)Le <sup>x</sup> , Le <sup>y</sup> , (s)Le <sup>a</sup> , Le <sup>b</sup>
$\alpha$ -1,3-	FucT-IV	Leukocytes, brain, myeloid cells	Type II	Le <sup>x</sup> , Le <sup>y</sup>
$\alpha$ -1,3-	FucT-V	Plasma, milk, liver	(Sialyl) type II	(s)Le <sup>x</sup> , Le <sup>y</sup>
$\alpha$ -1,3-	FucT-VI	Plasma, kidney, liver, colon	(Sialyl) type I and II	(s)Le <sup>x</sup> , (s)Le <sup>y</sup>
$\alpha$ -1,3-	FucT-VII	Leukocytes, high endothelial venules	Sialyl type II	sLe <sup>x</sup>
$\alpha$ -1,6-	FucT-VIII	Liver, brain, placenta, lung, stomach	GlcNAc $\beta$ 1,4-GalNAc	Fuc $\alpha$ 1,6-GlcNAc $\beta$ 1,4-GalNAc
$\alpha$ -1,3-	FucT-IX	Brain, stomach, spleen	Type II	Le <sup>x</sup>
$\alpha$ -1, <i>O</i> -	PO-FucT-I	Heart, brain, placenta, lung, liver	EGF-like repeats	Fucosyl-protein
$\alpha$ -1, <i>O</i> -	PO-FucT-II	Fetal liver, spleen, brain, heart	THBS-like repeats	Fucosyl-protein

**Tabela 1:** Distribuição das diferentes fucosiltransferases nos tecidos, os seus respetivos substratos aceitadores e produtos resultantes. Adaptado de: Tu et al, 2013.

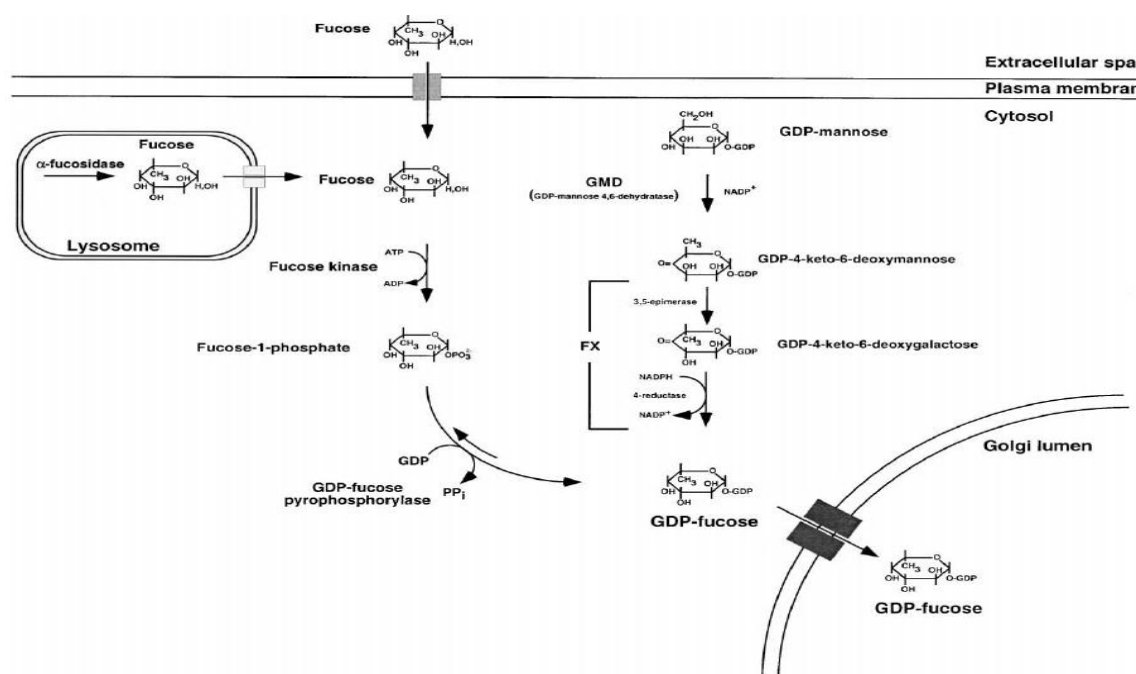
### 5.3.Síntese da GDP-Fucose, via de novo e via salvage

A fucose tal como os outros açúcares utilizados para a construção glicosídica dos recetores são obtidos maioritariamente a partir da dieta, embora alguns possam ser sintetizados pelo próprio organismo a partir da glucose (Kashyap et al, 2013).

Todas as FucTs utilizam a fucose na forma de nucleótido ativado. Existem dois processos para a síntese da GDP-fucose nas células de todos os mamíferos, designados

por via de *nov*o e via salvage e ambos se desenrolam no citosol da célula (Becker e Lowe, 2003; Zhai et al, 2015)

Na via de *novo* a GDP-fuc é sintetizada a partir do GDP-manose. A manose entra na célula e no citosol é fosforilada transformando-se em GDP-manose que por sua vez é convertida em GDP-Fucose ao fim de três reações enzimáticas na qual participam duas enzimas a GDP-manose 4,6- desidratase (GMD), a qual requer a presença do cofator NADP e a segunda enzima a GDP-keto-6-deoximanose 3,5-epimerase,4-redutase, também conhecida por proteína FX. Quando há uma grande concentração de produto final, a via de novo fica bloqueada devido ao efeito feedback negativo. A GDP-fucose funciona assim como um potente inibidor competitivo da GMD (Zhai et al, 2015).



**Figura 8:** Representação esquemática das duas vias de biossíntese de GDP-fucose nas células mamíferas. Adaptado de: Becker e Lowe, 2003.

Na via *salvage* a fucose é diretamente convertida em GDP-fucose. A fucose exógena atravessa a membrana celular por difusão facilitada específica para a fucose. Para além da dieta a fucose também pode ser obtida pelo catabolismo das glicoproteínas e glicolípidos no compartimento lisossomal. A fucose resultante da degradação dos recetores é libertada para o espaço lisossomal e sai para o citosol por difusão facilitada (Becker e Lowe, 2003; Baumgärtner et al, 2013; Zhai et al, 2015).



Na conversão de fucose em GDP-fucose estão envolvidas duas enzimas, a enzima fucose cinase do qual resulta a fucose-1-fosfato com gasto de ATP e libertação de ADP, e a GDP-fucose fosforilase que catalisa de seguida a condensação reversível da fucose-1-fosfato com GTP para formar a GDP-fucose (Sanz et al, 2013).

A GDP-fucose resultante das duas vias migram então para o complexo de Golgi onde irão ser utilizados. Estudos quantitativos demonstraram que no metabolismo da fucose nas células HeLa, 90% da GDP-fucose é obtida pela via de novo, mesmo quando as células são alimentadas com fucose marcada radioactivamente. (Becker e Lowe, 2003).

#### **5.4. A relação entre a fucosilação e doenças, especialmente o cancro**

Alterações da expressão dos glicanos na superfície das células estão relacionadas com várias doenças, como doenças inflamatórias crónicas, doenças autoimunes, fibrose cística e neoplasias (Orczyk-Pawilowicz, 2007).

Na fibrose cística existe um aumento da atividade das  $\alpha$ -1,3-fucosiltransferase resultando numa excessiva fucosilação dos glicanos nas células epiteliais que revestem as vias aéreas. A hiperfucosilação das mucinas aumenta a probabilidade de ocorrer uma infeção bacteriana pela pseudomonas aeruginosa, sendo esta uma das causas principais de morte nos doentes com fibrose cística (Scanlin e Glick, 1999; Rhim et al, 2004).

É frequente observar-se um aumento da expressão das glicosiltransferases como as N-acetil-glucosaminatransferases, fucosil-transferases e siali-transferases em vários tumores (X. Sun, 2013).

O aumento dos níveis de glicosil-transferases conduz ao aumento da sua atividade e consequentemente existe a uma elevada expressão de certas estruturas glicosiladas na superfície das células. O sL<sup>a</sup>, sLe<sup>x</sup>, Le, por exemplo, são epítomos cuja sua elevada expressão está correlacionada com um estado de tumor avançado. (Weston et al, 2011).

Os antígenos A e B dos grupos sanguíneos são muito reduzidos em vários tumores e os antígenos H e Le<sup>y</sup> bastante expressos, alterações que também estão associadas ao aumento da gravidade do tumor (Becker e Lowe, 2003).

Dentro dos epítomos, o sLe<sup>x</sup> é dos mais abundantes e mais associados a doenças, é muito comum encontrar uma elevada expressão nos tecidos neoplásicos incluindo cancro da mama, do colon, do fígado e dos pulmões (Weston et al, 2011).

A elevada concentração dos antígenos sLe<sup>x</sup> também foi observada na doença de Crohn, psoríase, artrite reumatoide e diabetes. O aumento significativo da expressão dos sLe<sup>x</sup> e Le<sup>x</sup> juntamente com o aumento da transcrição das fucosiltransferases-III e IV foram registados no cancro hepatocelular. A fucosiltransferase-VI promove o crescimento celular e atua também como um promotor tumoral. A FucT-IV, FucT-VII e o sLe<sup>x</sup> estão associadas a um agravamento do cancro dos pulmões (Tu et al, 2013).

Diversos estudos demonstram que o aumento do sLe<sup>x</sup> e sL<sup>a</sup> aumentam o risco de metastização do tumor. Estes antígenos presentes nas células cancerígenas ligam-se as células endoteliais dos vasos sanguíneos através das selectinas E- e P- e vão circulando ao longo dos vasos até chegar a outros locais do organismo onde se instalam e formam uma nova colónia neoplásica (Banquy et al, 2008).

O desenvolvimento de inibidores de fucosiltransferases como potentes fármacos anti-inflamatórios e anti-tumorais, são uma das estratégias bastante promissoras para o futuro. No entanto para o design de novos inibidores é necessário conhecer a estrutura da enzima, o tipo de ligações estabelecidas bem como os grupos funcionais envolvidos na interação da enzima com o substrato (Rillahan et al, 2012).

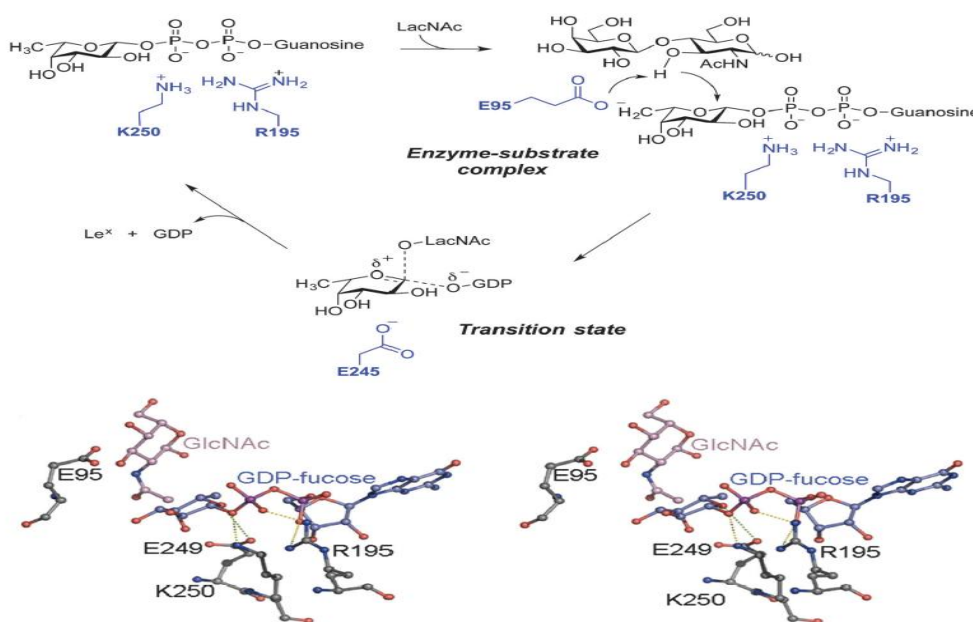
### **5.5.Estrutura e mecanismo das fucosiltransferases**

Até à data a única estrutura obtida por cristalografia raios x da  $\alpha$ -1,3-FucT é da bactéria *H.pylori*. A estrutura da enzima foi avaliada na forma complexada com o substrato aceitador e também com o produto final. Todas as fucosiltransferases requerem um substrato dador, a GDP-fucose, um ião  $Mn^{2+}$  e um substrato aceitador (Wright et al, 2013).

A ligação do GDP-fuc à FucT envolve as cargas positivas dos aminoácidos lisina-250 e arginina-195. Estes dois aminoácidos estabelecem interações eletrostáticas com as cargas negativas do grupo pirofosfato e ligações de hidrogénio, facilitando a clivagem da ligação glicosídica (Vries et al, 2001; H. Sun et al, 2007).

A N-acetil-lactosamina está localizada no domínio N-terminal, com o grupo 3-OH próximo da posição anomérica da GDP-fucose. O ácido glutâmico-95 encontra-se também no domínio N-terminal. Este aminoácido com características básicas aumenta a nucleofilicidade do 3-OH da N-acetil-lactosamina, fazendo com que este ataque o carbono anomérico da GDP-Fuc (H. Sun et al, 2007; Wang et al., 2009)

A transferência glicosídica é acompanhada da partida do grupo GDP e a formação de um oxocarcatião que constitui o estado de transição. A Glu-245, é o aminoácido que vai estabilizar o ião oxocarbocatião (H. Sun et al, 2007).



**Figura 9:** Representação do mecanismo catalítico da  $\alpha$ -1,3-FucT da *H. pylori*. as linhas a tracejado representam as pontes de hidrogénio. Adaptado de: H. Sun et al, 2007.

## 5.6. Inibidores das fucosiltransferases

Os inibidores das fucosiltransferases parecem ser uma grande promessa no design de fármacos dirigidos para o cancro, doenças auto-imunes e inflamatórias. No entanto existem algumas limitações no seu desenvolvimento, daí que apenas alguns compostos apresentam interesse terapêutico. Alguns fatores limitantes são a complexidade do estado de transição que envolve um açúcar nucleótido (substrato dador), um substrato aceitador e um ião metálico como cofactor. Segundo, a dificuldade de sintetizar um inibidor com características de ambos os substratos aceitador e dador. Outro fator

limitante deve-se à falta de informação sobre a enzima complexada com o substrato aceitador. Geralmente, as enzimas têm uma afinidade baixa com os substratos aceitadores, com valores do  $K_m$  na ordem dos sub-milimolares aos milimolares. Por este motivo a informação disponível de raios-x é muito limitada e consequentemente é difícil sintetizar análogos (Rillahan et al, 2012; Lin et al, 2012; Merino et al, 2012; Seelhorst et al, 2014).

Dado que as  $\alpha$ -1,3-FucT estão implicadas na síntese dos sLe<sup>x</sup> e Le<sup>x</sup> que são epítomos que se encontram em grande quantidade em vários tecidos neoplásicos, muitos cientistas procuram criar inibidores para estas enzimas de modo a impedir a formação destes açúcares (Seelhorst et al, 2014).

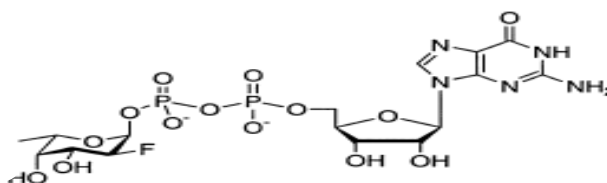
Para o design de um inibidor de enzima, é necessário conhecer as interações que existem entre o sítio ativo da enzima e o substrato. As interações entre o substrato e enzima devem ser suficientemente fortes para que ocorra a reação mas também devem ser fracas o suficiente para que o produto se liberte. Um inibidor competitivo deve estabelecer as mesmas interações que o substrato natural ou até mesmo interações adicionais que permitam ligar a enzima mas sem que depois ocorra reação, assim a enzima fica ocupada, bloqueando temporariamente o acesso ao substrato natural (Patrick, 2009).

Os inibidores das fucosiltransefrases podem-se dividir em três categorias, : os análogos dos substratos dadores, análogos dos substratos aceitadores e os inibidores bisubstratos (Tu et al, 2013).

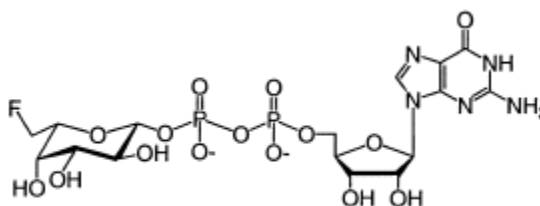
Vários foram os compostos sintetizados como análogos dos substratos dadores como os análogos contendo átomos de flúor, os carba-açúcares e ainda análogos do estado de transição. Para uma inibição potente o GDP tem de estar presente em todos os derivados sintetizados uma vez que este grupo contribui significativamente para uma ligação forte do substrato à enzima, estabelecendo as ligações de hidrogénio e interações eletrostáticas necessárias com a enzima (Merino et al, 2012).

Os átomos de fluor são frequentemente introduzidos nos fármacos ou inibidores enzimáticos devido à sua elevada eletronegatividade e a estabilidade pela ligação C-F ser forte (Tu et al, 2013).

Wong e seus colegas sintetizaram dois compostos contendo fluor, o GDP-2F-Fuc e a GDP-6F-Fuc, e testou a sua atividade inibitória *in vitro*. A carga negativa do átomo de fluor repela a carga negativa do ácido glutâmico 245, consequentemente há uma destabilização do carbocátion e a clivagem da ligação glicosídica é afetada. Os resultados do teste *in vitro* revelaram que os análogos fluorinados GDP-fucose possuem valores de  $K_i$  na ordem dos 1-36micro molaes para a FucT-III, V e VII (Burkart et al, 2000).



**Figura 10:** Representação do GDP-2F-Fuc. Fonte: Burkart et al, 2000.



**Figura 11:** Representação do GDP-6F-Fuc. Fonte: Burkart et al, 2000.

No entanto existe o problema destes compostos não conseguirem atravessar a membrana plasmática devido à carga negativa do grupo difosfato do nucleótido (Tu et al, 2013).

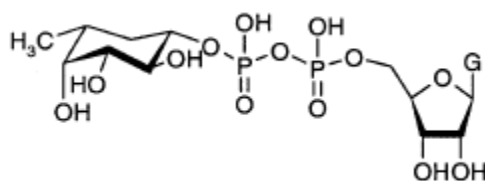
Rillahan et al, inspirados num estudo no qual se demonstrava que a 5-tio-N-acetil glucosamina (5-tio-GlcNAc) podia ser convertida no citoplasma da célula pela via salvage em UDP-5-tio-GlcNAc e seletivamente inibir a atividade da O-GlcNAc transferase, resolveram aplicar este conhecimento aos análogos de fucose (Rillahan et al, 2012).

Estes investigadores experimentaram os compostos 2F-Fuc e o 6F-Fuc peracetilados. A peracetilação permite aumentar a permeabilidade dos inibidores na membrana celular. Os inibidores foram introduzidos numa cultura de células HL-60 (células de leucemia humanas) e verificou-se que estes compostos atravessavam a membrana celular

provavelmente por difusão passiva. Já no citoplasma das células os derivados são desacetilados e convertidos pela via salvage nos substratos dadores, GDP-2F-Fuc e GDP-6F-Fuc. Anticorpos e lectinas com marcadores fluorescentes foram usados para detetar epítomos fucosilados através da técnica de citometria de fluxo. Os resultados demonstraram uma redução significativa da expressão de  $Le^x$  e  $sLe^x$  na superfície de células colocadas num meio com inibidor 2F-Fuc. Para além de atuarem como inibidores competitivos do substrato natural inibindo as fucosiltransferases no complexo de Golgi, estes inibidores bloqueiam a síntese natural do GDP-Fuc via *de novo* por feedback negativo, ou seja a concentração elevada de GDP-2F-Fuc e GDP-6F-Fuc bloqueia a biossíntese de mais GDP-Fuc (Rillahan et al, 2012).

Os carba açúcares sintéticos ou naturais, designados também por pseudoaçúcares são frequentemente preparados para várias aplicações biológicas e na investigação medicinal. Os carba açúcares são monossacáridos cujo átomo de oxigénio é substituído pelo átomo de carbono (Compain e Martin, 2001; Usami et al, 2008).

A ligação glicosídica que liga a fucose ao grupo guanosina difosfato é facilmente hidrolisável em meio ácido ou através da clivagem por uma enzima. Quando o oxigénio é substituído pelo carbono no anel fucose, não só aumenta a estabilidade contra a hidrólise como também aumenta a afinidade para a enzima ( $K_i = 67.1$  micromolar para FucT-V) ( Mitchell et al, 2002; Tu et al, 2013).

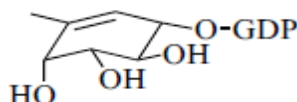


**Figura 12:** Representação de um carba-açúcar saturado. Fonte: Compain e Martin, 2001.

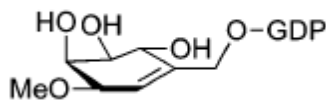
Os análogos do estado de transição são compostos que apresentam as características principais do estado de transição. Os valores do  $k_i$  dos análogos do estado de transição são mais baixos que os valores de  $K_m$  dos substratos, ou seja a ligação entre a enzima e o substrato no estado de transição é mais forte do que a enzima ligada ao substrato antes de atingir o estado de transição (Mitchell et al, 2002; Lee et al, 2003; Queneau et al, 2014)

Os análogos do estado de transição devem possuir as seguintes características: o anel de fucose deve ter uma conformação em meia cadeira, a ligação glicosídica deve ser extensa e deve desenvolver carga positiva para mimetizar a formação do oxocarbaníon (Mitchell et al, 2002; Queneau et al, 2014).

Com base nestes critérios Wong e a sua equipa sintetizaram dois carba açúcares que possuem ambos ligações duplas e em comparação com o GDP-carba-Fuc saturado (composto acima representado) tem um efeito inibitório mais potente. A presença de uma ligação dupla permite que o composto adote uma conformação em meia-cadeira como se pretende e a adição de um grupo metileno no segundo composto faz com que a ligação glicosídica fique mais extensa. Todos os compostos apresentaram *in vitro* resposta inibitória potente *in vitro*. No entanto o composto com a ligação glicosídica mais extensa apresentava maior atividade inibitória (Mitchell et al, 2002; Merino et al, 2012).

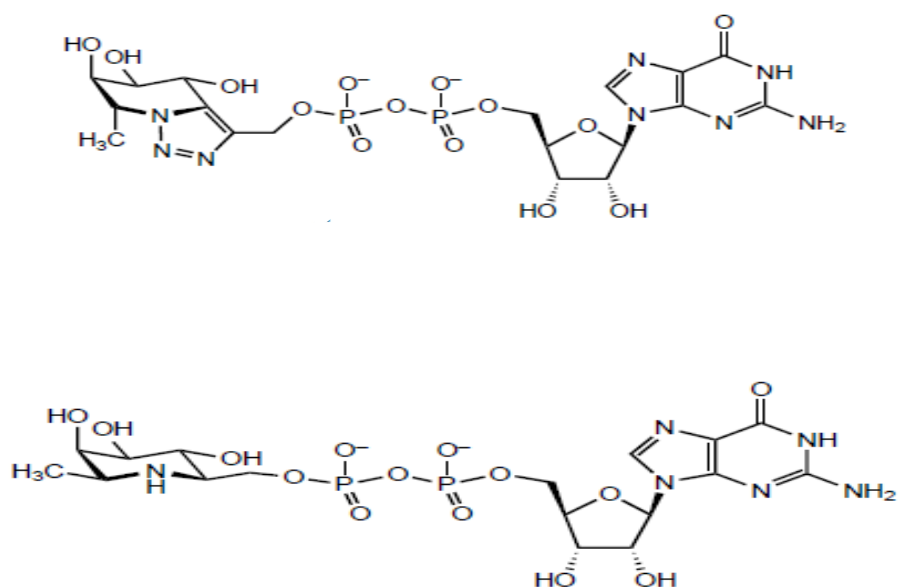


**Figura 13:** Representação de um carba açúcar com ligação dupla. Adaptado de: Merino et al, 2012.



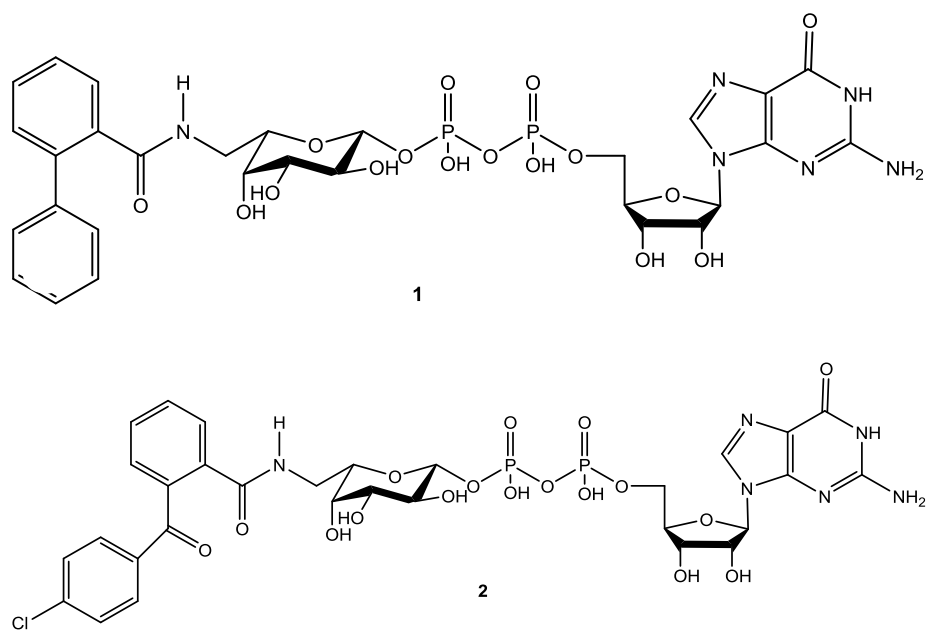
**Figura 14:** Representação de um carba açúcar com ligação dupla e um grupo metil que liga o grupo difosfato à fucose. Adaptado de: Tu et al, 2013.

Sintetizaram também os imino açúcares ou azaçúcares, representados na figura 15. Estes análogos a pH fisiológico ficam protonados adquirindo carga positiva para mimetizar o carbocatião do estado de transição. Ambos apresentam também um grupo metil para alongar a ligação glicosídica tal como o composto anterior (figura14). Ambas as moléculas possuem afinidade semelhante para a FucT-V e VI (Schuster e Blechert, 2001; Tu et al, 2013).

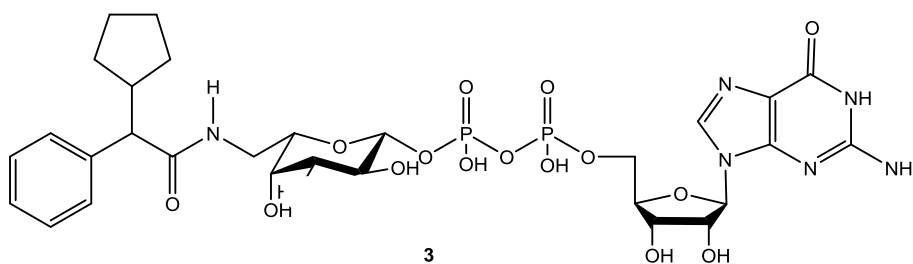


**Figura 15:** Representação de dois análogos iminoaçúcares ou Azaçúcares. Fonte: Mitchell et al, 2002.

Ainda em relação aos análogos de transição, Lin e sua equipa sintetizaram os compostos abaixo representados. A atividade inibitória foi testada para três  $\alpha$ -1,3-FucT, a FucT da *H. pylori* e a FucT-IV e V do ser humano (Lin et al, 2012).

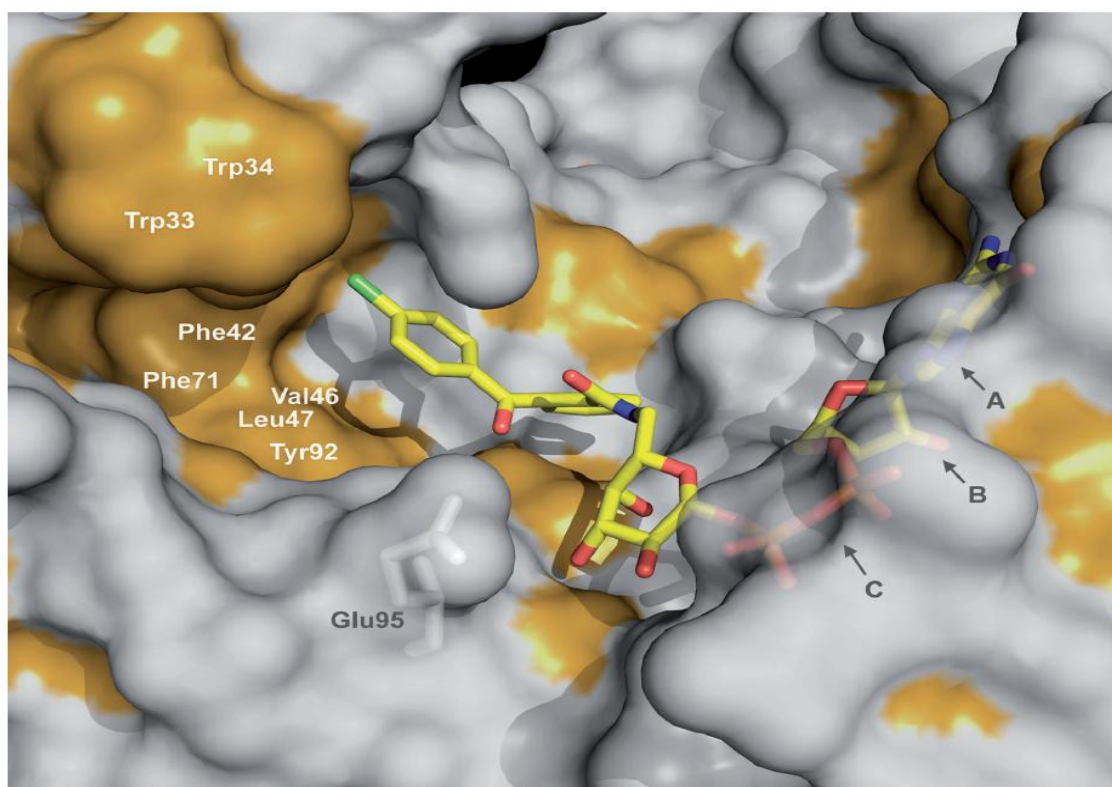






**Figura 16:** Representação estrutural de três compostos, análogos do estado de transição. Adaptado de: Lin et al, 2012.

Lin et al, adicionou grupos aromáticos à GDP-fuc com o intuito de aumentar as interações hidrofóbicas. Segundo Lin e sua equipa, a análise do modelo computacional da FucT da *H.pylori* complexada com o segundo composto, sugere existir uma fenda profunda formada por resíduos hidrofóbicos fazendo parte os resíduos Trp33, Trp34, Phe42, Leu47, Phe71 e Tyr92, perto do sítio ativo (Lin et al, 2012).



**Figura 17:** Representação de um modelo computacional do composto 2 ligado ao sítio ativo da FucT-*pylori*. No composto 2 o amarelo evidenciado corresponde ao carbono, o vermelho ao oxigénio, o azul ao nitrogénio, verde ao cloro e laranja ao fósforo. Os resíduos hidrofóbicos estão representados a laranja e o branco corresponde a outros resíduos de aminoácidos que fazem parte da enzima. A fenda hidrofóbica consiste nos aminoácidos Trp33, Trp34, Val46, Leu47, Phe42, Phe71 e Trp92. As setas A, B e C

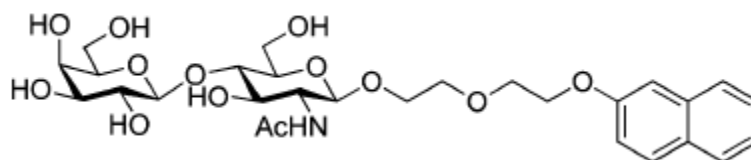
correspondem à guanina, ribose e grupo difosfato, respetivamente. O resíduo ácido glutâmico atua como ácido/base na catálise. Adaptado de: Lin et al, 2012.

Enzyme	IC <sub>50</sub> <sup>1</sup>	K <sub>i</sub>	IC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	K <sub>i</sub>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	K <sub>i</sub>	GDP-Fuc K <sub>m</sub>
FucT-V	2.7	0.81±0.15	1.2	0.52±0.11	0.69	0.31±0.09	13.8±2.3
FucT-VI	5.4	1.9±0.7	2.1	1.1±0.29	0.094	0.029±0.009	13.2±2.5
HP-FucT	3.9	0.9±0.2	0.78	0.22±0.06	26	7.8±0.7	11.3±2.2

**Tabela 2:** Valores de IC<sub>50</sub> e K<sub>i</sub> dos compostos 3-5 para as várias FucTs. Fonte: Lin et al, 2012.

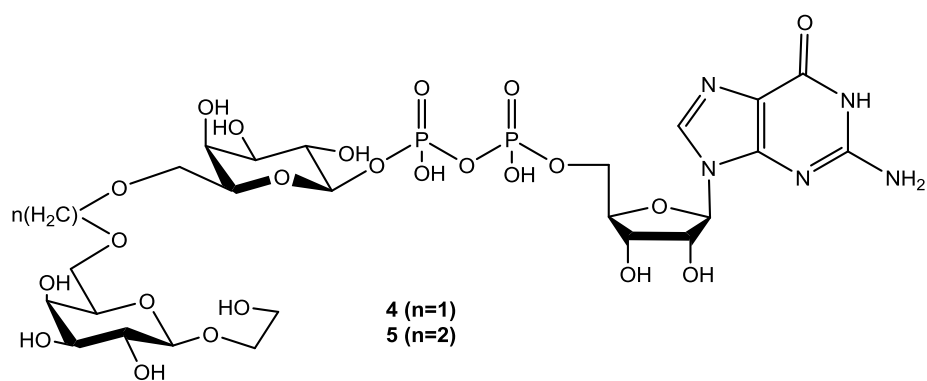
Desta experiência Lin e sua equipa concluíram que como os três compostos apresentavam atividade inibitória para todas as fucosiltransferases então o sítio ativo da enzima responsável pela ligação do GDP-Fuc é semelhante em todas as fucosiltransferases. Segundo estes autores, dentro destes compostos testados o composto número 3 mostrou ser o melhor inibidor, com valores de K<sub>i</sub> na ordem dos 29 nM e valor de IC<sub>50</sub> mais baixo que os outros compostos, no entanto apresentou pouca afinidade para a FucT *H.pylori* (Lin et al, 2012).

Para além dos análogos de substratos dadores, análogos dos substratos aceitadores, também já foram analisados e testados por Wong e seus colegas, uma série de derivados de LacNAc para inibir a expressão dos sLe<sup>x</sup>. Em comparação com o LacNAc (K<sub>m</sub>=4.6milimolar), os derivados do LacNAc exibem uma afinidade aumentada para a FucT-VI. O composto abaixo apresenta uma K<sub>m</sub> de 64 micromolares, sendo considerado pelos autores um bom substrato aceitador, competindo com a LacNAc. Numa concentração de 50 micromolar, este composto causa 90% da inibição de sLex expressas nas células U937 (células de linfoma humano) (Tu et al, 2013).



**Figura 18:** Representação de uma N-acetil-lactosamina ligada a um grupo hidrofóbico. Fonte: Tu et al, 2013.

Em relação aos inibidores bisubstratos são desenhados para conter ambos os domínios do substrato dador e aceitador ao mesmo tempo.



**Figura 19:** Representação de um inibidor bisubstrato. Fonte: Izumi et al, 2006.

O composto acima sintetizado por Wong e a sua equipa compreende um grupo 2-hidroxietil-β-D-galactosido que mimetiza o substrato aceitador e um GDP que mimetiza o substrato dador. A ligação glicosídica entre estes dois grupos dá-se por intermédio de uma cadeia de etileno. O composto foi testado e demonstrou ser um potente inibidor da α-1,2-FucT com uma  $K_i$  de 2,3 micromolar (Izumi et al, 2006).

## **6. CONCLUSÃO**

O desenvolvimento de inibidores de fucosiltransferases ainda está muito comprometido devido a várias limitações incluindo a pouca informação que existe destas enzimas.

Um inibidor ideal deve ter alta eficiência, uma constante de dissociação baixa, boa afinidade, especificidade e seletividade.

Nas fucosiltransferases ao contrário do que acontece nas fucosidases o sítio ativo não é um sulco profundo e por isso para que o substrato fique bem ligado a enzima necessita do nucleótido difosfato que lhe confere uma ligação mais forte a esta. Atualmente os inibidores das FucT mais potentes são aqueles que contêm na sua composição o nucleótido difosfato (GDP) para obter uma boa afinidade. No entanto estas moléculas possuem elevada polaridade ou carga negativa o que torna difícil a sua penetração nas membranas plasmáticas das células e ainda na membrana do aparelho de Golgi, uma vez que são nestes organitos que se encontram as fucosiltransferases.

Outro obstáculo ao desenvolvimento de inibidores de fucosiltransferase como possível tratamento para o cancro é o fato de existirem 12 fucosiltransferases humanas. A elevada atividade de certas fucosiltransferases está associada com diversos tipos de cancro e portanto é importante desenvolver inibidores potentes e seletivos para fucosiltransferases específicas, de modo a que os efeitos adversos sejam os mais reduzidos possíveis.

Os inibidores análogos dos substratos dadores apresentam a desvantagem de serem pouco seletivos, uma vez que todas as fucosiltransferases apresentam afinidade para a GDP-Fuc. Por outro lado os análogos dos substratos aceitadores apresentam baixa afinidade para a enzima. O design de bisubstratos parece ser mais promissor, pois apresenta elevada especificidade e afinidade, apresentando as características tanto do substrato doador como do aceitador.

O tratamento com um inibidor de sialitransferases resulta numa perda total de ácidos siálicos e num aumento significativo da fucosilação. Este aumento da fucosilação deve-se ao fato das fucosiltransferases e sialitransferases competirem para o mesmo substrato aceitador. Assim a inibição seletiva da transferência dos ácidos siálicos aumenta por

outro lado a transferência de fucose. O inverso também pode ocorrer com a inibição das fucosiltransferases, havendo um aumento de resíduos de ácidos siálicos nos epítomos ou antígenos.

O tratamento deve ser feito com ambos os inibidores para que haja uma redução notável de ácidos siálicos e fucose nos glicoconjugados. Este fato constitui outra limitação, pois para além de desenvolver um inibidor potente para as fucosiltransferases é necessário também desenvolver simultaneamente um inibidor para os ácidos siálicos. Este tratamento duplo pode levar a uma alongamento das cadeias glicosídicas das glicoproteínas por unidades repetitivas de N-acetil-lactosamina, devido à falta dos ácidos siálicos e fucose para fecharem as cadeias.

Diversas moléculas, nas últimas décadas foram desenhadas e testadas *in vitro* para inibir as fucosiltransferases. Contudo, como foi apresentado acima, existem várias barreiras ainda a ultrapassar, para passar dos ensaios *in vitro* aos ensaios clínicos. Com o avanço da tecnologia, o conhecimento mais aprofundado das interações entre estas enzimas e os seus substratos será possível, e portanto prevê-se que num futuro próximo sejam aperfeiçoados os inibidores destas fucosiltransferases, de forma a serem mais selectivos, eficazes e minimizando os efeitos adversos.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Aguiar, D. C. F., Corvelo, T. C. O., Araújo, M., Cruz, E. M. da, Daibes, S., & Assumpção, M. B. de. (2002). Expressão dos antígenos ABH e Lewis na gastrite crônica e alterações pré- neoplásica da mucosa gástrica. *Arquivos de Gastroenterologia*, 39(4), 222–232. doi:10.1590/S0004-28032002000400004
- Ahn, S. G., Park, J. T., Lee, H. M., Lee, H. W., Jeon, T. J., Han, K., ... Jeong, J. (2014). Standardized uptake value of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for prediction of tumor recurrence in breast cancer beyond tumor burden. *Breast Cancer Research*, 16(6). doi:10.1186/s13058-014-0502-y
- Aldridge, S. (2008). The icing on the cake, (April).
- Ambrosi, M., Cameron, N. R., & Davis, B. G. (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3(9), 1593–1608. doi:10.1039/b414350g
- Ananthula, S. (2014). Bioavailability and Bioequivalence Issues Associated With Oral Anticancer Drugs and Effect on Drug Market, 6(6). doi:10.4172/jbb.10000e56
- Aparicio, L. A., Calvo, M. B., Figueroa, A., Pulido, E. G., & Campelo, R. G. (2010). Potential role of sugar transporters in cancer and their relationship with anticancer therapy. *International Journal of Endocrinology*, 2010. doi:10.1155/2010/205357
- Banquy, X., Rabanel, J., Argaw, A., Hildgen, P., & Giasson, S. (2008). Selectins Ligand Decorated Drug Carriers for Activated Endothelial Cell Targeting.
- Becker, D. J., & Lowe, J. B. (2003). Fucose: Biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology*, 13(7). doi:10.1093/glycob/cwg054
- Borgman, M. P., Aras, O., Geyser-stoops, S., Sausville, E. A., & Ghandehari, H. (2010). NIH Public Access, 6(6), 1836–1847. doi:10.1021/mp900134c.Biodistribution
- Brand, R. a. (2010). Biographical sketch: Otto Heinrich Warburg, PhD, MD. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 468(11), 2831–2832. doi:10.1007/s11999-010-1533-z
- Breton, C., Oriol, R., & Imberty, A. (1998). Conserved structural features in eukaryotic and prokaryotic fucosyltransferases. *Glycobiology*, 8(1), 87–94. doi:10.1093/glycob/8.1.87
- Brzezinski, K., Dauter, Z., & Jaskolski, M. (2012). Structures of NodZ  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase in complex with GDP and GDP-fucose. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 68(2), 160–168. doi:10.1107/S0907444911053157
- Burkart, M. D., Vincent, S. P., Düffels, A., Murray, B. W., Ley, S. V., & Wong, C. H. (2000). Chemo-enzymatic synthesis of fluorinated sugar nucleotide: Useful

- mechanistic Probes for glycosyltransferases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 8(8), 1937–1946. doi:10.1016/S0968-0896(00)00139-5
- Cai, S., Thati, S., Bagby, T. R., Diab, H. M., Davies, N. M., Cohen, M. S., & Forrest M. Laird, M. L. (2010). Localized doxorubicin chemotherapy with a biopolymeric nanocarrier improves survival and reduces toxicity in xenografts of human breast cancer. *Journal of Controlled Release*, 146(2), 212–218. doi:10.1016/j.jconrel.2010.04.006
- Chen, C. (2012). Development of a Novel Class of Glucose Transporter Inhibitors, 1.
- Clark, G. F. (2014). A role for carbohydrate recognition in mammalian sperm-egg binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(3), 1195–1203. doi:10.1016/j.bbrc.2014.06.051
- Compain, P., & Martin, O. R. (2001). Carbohydrate mimetics-based glycosyltransferase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 9(12), 3077–3092. doi:10.1016/S0968-0896(01)00176-6
- Danguy, A., Camby, I., & Kiss, R. (2002). Galectins and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1572(2-3), 285–293. doi:10.1016/S0304-4165(02)00315-X
- David, a., Kopečková, P., Minko, T., Rubinstein, A., & Kopeček, J. (2004). Design of a multivalent galactoside ligand for selective targeting of HPMA copolymer-doxorubicin conjugates to human colon cancer cells. *European Journal of Cancer*, 40(1), 148–157. doi:10.1016/j.ejca.2003.07.001
- David, A. (2010). Carbohydrate-based biomedical copolymers for targeted delivery of anticancer drugs. *Israel Journal of Chemistry*, 50(2), 204–219. doi:10.1002/ijch.201000021
- Davis, B. G., & Robinson, M. a. (2002). Drug delivery systems based on sugar-macromolecule conjugates. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 5(2), 279–288.
- Del Carmen Fernández-Alonso, M., Díaz, D., Berbis, M. Á., Marcelo, F., Cañada, J., & Jiménez-Barbero, J. (2012). Protein-carbohydrate interactions studied by NMR: from molecular recognition to drug design. *Current Protein & Peptide Science*, 13(8), 816–30. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3706953&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Duncan, R. (2006). Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nature Reviews. Cancer*, 6(9), 688–701. doi:10.1038/nrc1958
- Duncan, R. (2009). Development of HPMA copolymer-anticancer conjugates: Clinical experience and lessons learnt. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(13), 1131–1148. doi:10.1016/j.addr.2009.05.007

- Ernst, B., & Magnani, J. L. (2009). From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 8(8), 661–677. doi:10.1038/nrd2852
- Feng, X. (2010). Polymeric Conjugates for Anti-cancer Drug Delivery, 50–52.
- Fonseca, N. B. D. S., & Soto-Blanco, B. (2014). Toxicidade da ricina presente nas sementes de mamona. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(3), 1415. doi:10.5433/1679-0359.2014v35n3p1415
- Garófalo, a, Avesani, C. M., Camargo, K. G., Barros, M. E., Silva, S. R. J., Taddei, J. a D. a C., & Sigulem, D. M. (2004). Diet and cancer: An epidemiological view. *Dieta E Câncer: Um Enfoque Epidemiológico*, 17(4), 491–505. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-14044262195&partnerID=40&md5=e4edea874df933e6b0e41f29d80c4168>
- Ghazarian, H., Idoni, B., & Oppenheimer, S. B. (2011). A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica*, 113(3), 236–47. doi:10.1016/j.acthis.2010.02.004
- Gupta, A., Gupta, R. K., & Gupta, G. S. (2009). Targeting cells for drug and gene delivery: Emerging applications of mannans and mannan binding lectins. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 68(6), 465–483.
- Haynes, B. F., Moody, M. A., Alam, M., Bonsignori, M., Verkoczy, L., Ferrari, G., ... Kelsoe, G. (2014). Progress in HIV-1 vaccine development. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(1), 3–10. doi:10.1016/j.jaci.2014.04.025
- Hockenbery, D. M., Tom, M., & Abikoff, C. (2013). Cell Death Signaling in Cancer Biology and Treatment, 35–52. doi:10.1007/978-1-4614-5847-0
- Holmskov, U., Thiel, S., & Jensenius, J. C. (2003). Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annual Review of Immunology*, 21, 547–578. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.140954
- Ihara, H., Ikeda, Y., & Taniguchi, N. (2006). Reaction mechanism and substrate specificity for nucleotide sugar of mammalian  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase - A large-scale preparation and characterization of recombinant human FUT8. *Glycobiology*, 16(4), 333–342. doi:10.1093/glycob/cwj068
- Izumi, M., Kaneko, S., Yuasa, H., & Hashimoto, H. (2006). Synthesis of bisubstrate analogues targeting alpha-1,3-fucosyltransferase and their activities. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4(4), 681–690. doi:10.1039/b513897c
- Jong, W. H. De. (2008). Drug delivery and nanoparticles : Applications and hazards, 3(2), 133–149.
- Kashyap, P. C., Marcobal, A., Ursell, L. K., Smits, S. a, Sonnenburg, E. D., Costello, E. K., ... Sonnenburg, J. L. (2013). Genetically dictated change in host mucus carbohydrate landscape exerts a diet-dependent effect on the gut microbiota.



- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(42), 17059–64. doi:10.1073/pnas.1306070110
- Kayser, K., Hoeft, D., Hufnagi, P., Caselitz, J., Zick, Y., André, S., ... Gabius, H.-J. (2003). Combined analysis of tumor growth pattern and expression of endogenous lectins as a prognostic tool in primary testicular cancer and its lung metastases. *Histology and Histopathology*, 18(3), 771–779.
- Khowala, S., Verma, D., & Banik, S. P. (2008). BIOMOLECULES : ( INTRODUCTION , STRUCTURE & FUNCTION ) Carbohydrates.
- Kimura, H., Shinya, N., Nishihara, S., Kaneko, M., Irimura, T., & Narimatsu, H. (1997). Distinct substrate specificities of five human alpha-1,3-fucosyltransferases for in vivo synthesis of the sialyl Lewis x and Lewis x epitopes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(1), 131–137. doi:10.1006/bbrc.1997.7100
- Klyosov, A. A. (2014). Galectins as New Therapeutic Targets for Galactose-Containing Polysaccharides, 8(1).
- Klyosov, A. A., Therapeutics, G., & Avenue, W. (2012). Carbohydrates and Drug Design.
- Kobayashi, H., Watanabe, R., & Choyke, P. L. (2014). T h e r a n o s t i c s Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention ( EPR ) Effects ; What Is the Appropriate Target ?, 4(1). doi:10.7150/thno.7193
- Kopeckova, P. (2001). Water soluble polymers in tumor targeted delivery, 74, 147–158.
- Koppenol, W. H., Bounds, P. L., & Dang, C. V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews. Cancer*, 11(5), 325–337. doi:10.1038/nrc3108
- Kovar, L., Etrych, T., Kabesova, M., Subr, V., Vetvicka, D., Hovorka, O., ... Chytil, P. (2010). Doxorubicin attached to HPMa copolymer via amide bond modifies the glycosylation pattern of EL4 cells. doi:10.1007/s13277-010-0019-7
- Kritzer, J. A., Luedtke, N. W., Haven, N., Mit, A. T., Harvard, P. L., Yale, P. L., ... This, Y. (2005). Chemical Biology : Innovative Solutions for Diverse Challenges, 12, 617–620. doi:10.1016/j.chembiol.2005.06.004
- Ledoux, É., & Cloutier, E. (2012). Introductory Article. *Relations Industrielles*, 67(2), 171. doi:10.7202/1009082ar
- Lee, L. V, Mitchell, M. L., Huang, S.-J., Fokin, V. V, Sharpless, K. B., & Wong, C.-H. (2003). A potent and highly selective inhibitor of human alpha-1,3-fucosyltransferase via click chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, 125(32), 9588–9589. doi:10.1021/ja0302836

- Ley, K. (2003). The role of selectins in inflammation and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 9(6), 263–268. doi:10.1016/S1471-4914(03)00071-6
- Lin, Y. N., Stein, D., Lin, S. W., Chang, S. M., Lin, T. C., Chuang, Y. R., ... Lin, C. H. (2012). Chemoenzymatic synthesis of GDP-L-fucose derivatives as potent and selective  $\alpha$ -1,3-fucosyltransferase inhibitors. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 354(9), 1750–1758. doi:10.1002/adsc.201100940
- Lira-Navarrete, E., Valero-González, J., Villanueva, R., Martínez-Júlvez, M., Tejero, T., Merino, P., ... Hurtado-Guerrero, R. (2011). Structural insights into the mechanism of protein O-fucosylation. *PLoS ONE*, 6(9). doi:10.1371/journal.pone.0025365
- Lives, T. (2012). AACR Cancer Progress Report 2012. *Clinical Cancer Research*. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2891
- Loeb, K. R., & Loeb, L. a. (2000). Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), 379–385. doi:10.1093/carcin/21.3.379
- Lopes, a. a, Oliveira, a. M., & Prado, C. B. C. (2002). Principais genes que participam da formação de tumores. *Revista De Biologia E Ciências Da Terra*, 2.
- López-lázaro, M. (2008). The Warburg Effect : Why and How do Cancer Cells Activate Glycolysis in the Presence of Oxygen ?, 305–312.
- Lu, Y., & Mahato, R. I. (2009). *Pharmaceutical perspectives of cancer therapeutics. Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics*. doi:10.1007/978-1-4419-0131-6
- Ma, B., Simala-Grant, J. L., & Taylor, D. E. (2006). Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology*, 16(12). doi:10.1093/glycob/cwl040
- Machado, U. F. (1998). Transportadores de Glicose.
- Macheda, M. L., Rogers, S., & Best, J. D. (2005). Molecular and Cellular Regulation of Glucose Transporter ( GLUT ) Proteins in Cancer, 662(April 2004), 654–662. doi:10.1002/jcp.20166
- Mak, T. W., & Saunders, M. E. (2011). *Primer to the Immune Response: Academic Cell Update Edition*. Academic Press. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=iuBiMLiHyjcC&pgis=1>
- Mandal, S., Moudgil, M., & Mandal, S. K. (2009). Rational drug design. *European Journal of Pharmacology*, 625(1-3), 90–100. doi:10.1016/j.ejphar.2009.06.065
- Merino, P., Tejero, T., Delso, I., Hurtado-Guerrero, R., Gómez-SanJuan, A., & Sádaba, D. (2012). Recent progress on fucosyltransferase inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(14), 1455–64. doi:MRMC-EPUB-20120611-3 [pii]

- Mitchell, M. L., Tian, F., Lee, L. V., & Wong, C.-H. (2002). Synthesis and evaluation of transition state analogue inhibitors of  $\alpha$ -1,3-fucosyltransferase. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41(16), 3041–3044.
- Muinelo-Romay, L., Vázquez-Martín, C., Villar-Portela, S., Cuevas, E., Gil-Martín, E., & Fernández-Briera, A. (2008). Expression and enzyme activity of  $\alpha$ (1,6)fucosyltransferase in human colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 123(3), 641–646. doi:10.1002/ijc.23521
- Munson, J. M., & Shieh, A. C. (2014). Interstitial fluid flow in cancer : implications for disease progression and treatment, 317–328.
- Murphy, P. V., André, S., & Gabius, H. J. (2013). The third dimension of reading the sugar code by lectins: Design of glycoclusters with cyclic scaffolds as tools with the Aim to Define Correlations between spatial presentation and activity. *Molecules*, 18(4), 4026–4053. doi:10.3390/molecules18044026
- Nicholas Pettit, Thomas Styslinger, Zhen Mei, Weiqing Han, Guohui Zhao, and P. G. W. (2012). NIH Public Access. *Characterization of WbiQ: An  $\alpha$ 1,2-Fucosyltransferase from Escherichia Coli O127:K63(B8), and Synthesis of H-Type 3 Blood Group Antigen*, 1–14. doi:10.1016/j.bbrc.2010.08.087.Characterization
- Norman, B. K. E., Anderson, G. P., Kolb, H. C., Ley, K., & Ernst, B. (1998). Sialyl Lewis, 475–483.
- Orczyk-Pawilowicz, M. (2007). [The role of fucosylation of glycoconjugates in health and disease]. *Postępy Higieny I Medycyny Doświadczalnej (Online)*, 61, 240–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507872>
- Otero-estévez, O., Martínez-fernández, M., & Vázquez-iglesias, L. (2013). Decreased Expression of Alpha- L -Fucosidase Gene FUCA1 in Human Colorectal Tumors, 16986–16998. doi:10.3390/ijms140816986
- Pawar, S. K., Badhwar, A. J., Kharas, F., Khandare, J. J., & Vavia, P. R. (2012). Design, synthesis and evaluation of N-acetyl glucosamine (NAG)-PEG-doxorubicin targeted conjugates for anticancer delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1-2), 183–193. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.05.078
- Queeg, C., Mutiny, T. C., & Mason, P. (1994). Chapter 7, 2, 1–54. doi:10.1016/B978-0-7020-3369-8.00007-0
- Rajora, A., Ravishankar, D., Osborn, H., & Greco, F. (2014). Impact of the Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect and Cathepsins Levels on the Activity of Polymer-Drug Conjugates. *Polymers*, 6(8), 2186–2220. doi:10.3390/polym6082186
- Raska, M., Czernekova, L., Moldoveanu, Z., Zachova, K., Elliott, M. C., Novak, Z., ... Novak, J. (2014). Differential glycosylation of envelope gp120 is associated with differential recognition of HIV-1 by virus-specific antibodies and cell infection, 11(1), 1–16. doi:10.1186/1742-6405-11-23

- Rillahan, C. D., Antonopoulos, A., Lefort, C. T., Sonon, R., Azadi, P., Ley, K., ... Paulson, J. C. (2012). Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome. *Nature Chemical Biology*, 8(7), 661–8. doi:10.1038/nchembio.999
- Robilotta, C. C. (Universidade D. S. P. (2006). Positron emission tomography: a new modality in Brazilian nuclear medicine. *Pan American Journal of Public Health*, 20(2-3), 134–142. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892006000900014
- Sanz, S., Bandini, G., Ospina, D., Bernabeu, M., Marino, K., Fernandez-Becerra, C., & Izquierdo, L. (2013). Biosynthesis of GDP-fucose and Other Sugar Nucleotides in the Blood Stages of Plasmodium falciparum. *Journal of Biological Chemistry*, 288(23), 16506–16517. doi:10.1074/jbc.M112.439828
- Scanlin, T. F., & Glick, M. C. (1999). Terminal glycosylation in cystic fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1455(2-3), 241–253. doi:10.1016/S0925-4439(99)00059-9
- Schuster, M., & Blechert, S. (2001). Inhibition of fucosyltransferase V by a GDP-azasugar. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 11(14), 1809–1811. doi:10.1016/S0960-894X(01)00282-7
- Schuster-Gossler, K., Harris, B., Johnson, K. R., Serth, J., & Gossler, A. (2009). Notch signalling in the paraxial mesoderm is most sensitive to reduced Pofut1 levels during early mouse development. *BMC Developmental Biology*, 9, 6. doi:10.1186/1471-213X-9-6
- Seam, P., Juweid, M. E., Cheson, B. D., & Dc, W. (2011). The role of FDG-PET scans in patients with lymphoma Review in translational hematology The role of FDG-PET scans in patients with lymphoma, 110(10), 3507–3516. doi:10.1182/blood-2007-06-097238
- Seelhorst, K., Piernitzki, T., Lunau, N., Meier, C., & Hahn, U. (2014). Synthesis and analysis of potential  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(22), 6430–6437. doi:10.1016/j.bmc.2014.09.038
- Sharma, D., Vaishnav, Y., & Deshmukh, V. S. (2013). A review on drug designing, methods, its applications and prospects. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 5(0974), 15–30.
- Shimoda, Y., Tajima, Y., Osanai, T., Katsume, A., Kohara, M., Kudo, T., ... Sanai, Y. (2002). Pax6 controls the expression of Lewis x epitope in the embryonic forebrain by regulating  $\alpha$ 1,3-Fucosyltransferase IX expression. *Journal of Biological Chemistry*, 277(3), 2033–2039. doi:10.1074/jbc.M108495200
- Shohdy, K. S., & Alfaar, A. S. (2013). ut h or oo Pr ut h Pr oo, 4, 1–13.
- Society, A. C. (2013). What is chemotherapy ? How chemotherapy works. *American Cancer Society*, 1–29. Retrieved from www.cancer.org

- Stanley, P., Schachter, H., & Taniguchi, N. (2009). N-Glycans. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1917/>
- Sun, H., Lin, S., Ko, T., Pan, J., Liu, C., & Lin, C. (2007). Structure and Mechanism of Helicobacter pylori Fucosyltransferase A BASIS FOR LIPOPOLYSACCHARIDE VARIATION AND INHIBITOR DESIGN \* □, 282(13), 9973–9982. doi:10.1074/jbc.M610285200
- Sun, X. (2013). Medicinal chemistry Glycosyltransferases as Potential Drug Targets, 3(1), 1–2. doi:10.4172/2161-0444.1000e106
- Taveira, L. C. de O. E. J. F. T. L. G. S. R. N. M. E. M. L. S. F. (2012). Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos : Revisão de Literatura Applications of Lipid Nanocarriers for Solid Tumors Therapy : Literature Review, 58(4), 695–701.
- Tu, Z., Lin, Y.-N., & Lin, C.-H. (2013). Development of fucosyltransferase and fucosidase inhibitors. *Chemical Society Reviews*, 42(10), 4459–75. doi:10.1039/c3cs60056d
- Varki, A., Freeze, H. H., & Gagneux, P. (2009). Evolution of Glycan Diversity. *Essentials of Glycobiology*, 281–689. doi:NBK1942 [bookaccession]
- Vendrell, M., Samanta, A., Yun, S.-W., & Chang, Y.-T. (2011). Synthesis and characterization of a cell-permeable near-infrared fluorescent deoxyglucose analogue for cancer cell imaging. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 9(13), 4760–4762. doi:10.1039/c1ob05519d
- Vries, T. De, Knegt, R. M. A., Holmes, E. H., & Macher, B. A. (2001). Fucosyltransferases : structure / function studies, 11(10), 119–128.
- Wang, W., Hu, T., Frantom, P. A., Zheng, T., Gerwe, B., Del Amo, D. S., ... Wu, P. (2009). Chemoenzymatic synthesis of GDP-L-fucose and the Lewis X glycan derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16096–101. doi:10.1073/pnas.0908248106
- Weston B. Struwe, Eoin F.J. Cosgrave, Jennifer C. Byrne, Radka Saldova, and P. M. R. (2011). Glycoproteomics in Health and disease.
- Witczak, Z. J., Poplawski, T., Czubatka, A., Sarnik, J., Tokarz, P., VanWert, A. L., & Bielski, R. (2014). A potential CARB-pharmacophore for antineoplastic activity: part 1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(7), 1752–7. doi:10.1016/j.bmcl.2014.02.036
- Wood-Charlson, E. M., & Weis, V. M. (2009). The diversity of C-type lectins in the genome of a basal metazoan, Nematostella vectensis. *Developmental and Comparative Immunology*, 33(8), 881–889. doi:10.1016/j.dci.2009.01.008
- Wright, D. W., Moreno-Vargas, A. J., Carmona, A. T., Robina, I., & Davies, G. J. (2013). Three dimensional structure of a bacterial  $\alpha$ -L-fucosidase with a 5-

- membered iminocyclitol inhibitor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21(16), 4751–4754. doi:10.1016/j.bmc.2013.05.056
- Yin, H., Liao, L., & Fang, J. (2014). Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect Based Tumor Targeting : The Concept , Application and Prospect. *JSM Clin Oncol Res*, 2(1), 1–5. doi:10.1007/978-1-60761-609-2\_3
- Zhai, Y., Han, D., Pan, Y., Wang, S., & Fang, J. (2015). Enzyme and Microbial Technology Enhancing GDP-fucose production in recombinant *Escherichia coli* by metabolic pathway engineering. *Enzyme and Microbial Technology*, 69, 38–45. doi:10.1016/j.enzmictec.2014.12.001
- Zhang, D., Li, J., Wang, F., Hu, J., Wang, S., & Sun, Y. (2014). 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer Letters*, 355(2), 176–183. doi:10.1016/j.canlet.2014.09.003